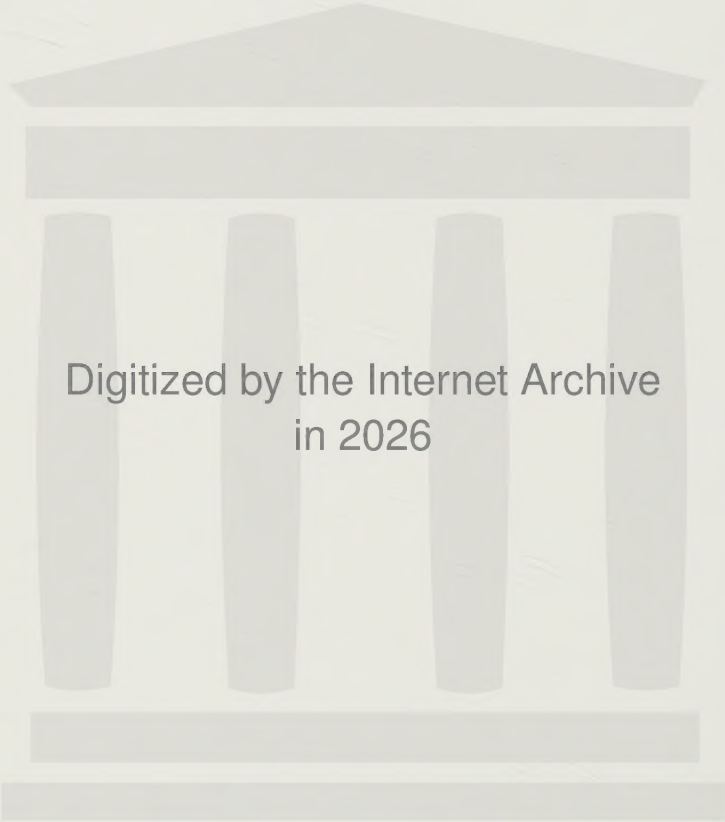


**Insulinspezifische Immunsuppression
durch kovalent an
Poly(N-vinylpyrrolidon) (PVP)
gebundenes Insulin**

Jürgen Rapp



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0024

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Universität München
- Klinikum Großhadern -
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel

INSULINSPEZIFISCHE IMMUNSUPPRESSION DURCH KOVALENT
AN POLY(N-VINYLPYRROLIDON) (PVP) GEBUNDENES INSULIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jürgen Rapp
München
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. B.U. von Specht
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Brendel
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	13.05.1986

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Insulin-Allergie und Insulin-Resistenz</u>	3
- Eine kurze Einführung -	
C. <u>Material und Methoden</u>	9
I. Allgemeine Hinweise	9
II. Tiermodell	9
III. Antigene und Tolerogene	9
1. Insuline	9
2. PVP-Insulin-Konjugate	10
IV. Immunisierung und Messung der Serum- antikörperaktivität	10
V. Lymphozytentransformationstest LTT	11
VI. Haemolytischer Plaque-Test	12
1. Kopplung von Insulin an Erythrozyten	12
2. Benötigte Reagenzien und Materialien	15
3. Zellgewinnung	16
4. Durchführung	17
VII. Zelltransfer	22
D. <u>Ergebnisse</u>	24
I. Nähere Charakterisierung der herge- stellten PVP-Insulin-Konjugate	24

	Seite
II. Vergleich der verschiedenen PVP-Insulin-Konjugate in ihrer Wirkung auf die primäre Immunantwort gegenüber nativem Insulin	28
III. Wirkung von PVP-Insulin auf die sekundäre Immunantwort gegenüber nativem Insulin	33
IV. Darstellung der Wirkung von PVP-Insulin anhand des Lymphozytentransformations- tests	36
V. Nachweis von Anti-Insulin-Ig sezernierenden Zellen durch den haemolytischen Plaque-Test	42
1. Überprüfung des Tests hinsichtlich Eignung für das geplante Experiment und Spezifitätskontrolle	42
2. Haemolytischer Plaque-Test zur Überprüfung der Wirkung von PVP-Insulin im Rahmen einer Sekundärantwort	48
3. Nachweis der IgG-Subklassenspezifität der Anti-Insulin-Immunantwort unter PVP-Insulin	50
4. Zusammenfassung	52
VI. Zelltransferexperiment	53
VII. Versuch einer Simulation der klinischen Situation eines insulinresistenten Diabetikers	58
E. <u>Diskussion</u>	62

	Seite
I. Besprechung der Ergebnisse im Einzelnen	62
1. Vorbemerkungen	62
2. Die Bestimmung der Serumantikörperaktivitäten gegenüber Insulin	62
3. Der Lymphozytentransformationstest (LTT)	67
4. Die Ergebnisse des haemolytischen Plaque-Tests	68
5. Der Zelltransfer und seine Aussagen	71
II. PVP-Insulin als neuer therapeutischer Ansatz gegen Insulin-Resistenz	74
F. <u>Zusammenfassung</u>	78
G. <u>Literaturverzeichnis</u>	80

A: Einleitung:

Als im Jahre 1922 das Insulin durch Banting und Best entdeckt wurde, dachte vermutlich noch keiner an immunologische Reaktionen des Körpers auf dieses Hormon. Doch schon wenige Zeit nach den ersten therapeutischen Anwendungen wurden allergische Erscheinungen auf die Präparate des Insulins beschrieben. Beispiele hierfür sind die Berichte von Joslin et al. 1922 (17) und Tuft 1928 (51).

Obwohl zwischenzeitlich große Verbesserungen in der Reinigung und Aufbereitung von Insulin erreicht werden konnten, lassen sich bei den unterschiedlichen Darreichungsformen auch nach über einem halben Jahrhundert medizinischer Anwendung immer noch antigene Eigenschaften nachweisen. Von den dadurch entstehenden verschiedenen klinischen Reaktionstypen sind Hautallergien an den Injektionsstellen und die chronisch verminderte Insulin-Ansprechbarkeit (Insulin-Resistenz) durch zirkulierende neutralisierende Insulin-Antikörper als die häufigsten zu nennen. (29)

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen neuen therapeutischen Ansatz gegen die antikörperinduzierte Insulin-Resistenz bei Diabetikern zu finden. Wie anhand von früheren Untersuchungen bereits gezeigt werden konnte, kann die Immunantwort auf Proteine und Haptene protein- oder haptenspezifisch supprimiert werden, indem man das entsprechende Protein oder Hapten an Polyvinylpyrrolidon (= PVP) koppelt. PVP befand sich früher als Plasmaexpander unter der Bezeichnung Periston^R im Handel. Beispiele für Proteinantigene die an PVP gekoppelt wurden sind eine Timothy-Pollenallergenfraktion (44), für Haptene 4-Hydroxy-3-jodo-5-nitrophenyl (NIP). So ist z.B. an PVP gebundenes NIP in der Lage die IgE- (31) und IgG- (45) Immunantwort gegen NIP zu supprimieren.

Als Mechanismus konnte die Induktion von NIP spezifischen T-Suppressorzellen nachgewiesen werden.

Wie im weiteren beschrieben, wurde versucht durch Kopplung von Rinder- und Schweineinsulin an PVP ähnliche Effekte auf die Immunantwort gegenüber nativem Insulin zu erreichen. Nach einem Einführungskapitel über Insulin-Allergie und Insulin-Resistenz folgen im Anschluß an die Beschreibung der verwendeten Materialien und Methoden zunächst nähere Angaben über Herstellung und Charakterisierung der PVP-Insulin-Konjugate. Hierauf erfolgt als Kern dieser Arbeit die detaillierte Darstellung der immunologischen Effekte von PVP-Insulin-Konjugaten im Tiermodell anhand verschiedener Testmethoden.

B: Insulin-Allergie und Insulin-Resistenz

- Eine kurze Einführung -

Um dem Leser den Einstieg in den Themenkreis zu erleichtern, soll im vorliegenden Kapitel auf die Insulin-Allergie und Insulin-Resistenz kurz eingegangen werden.

Ausführliche Übersichten zu dieser Thematik von Kühnau jr. (29) und Kahn und Rosenthal (19) bildeten eine wesentliche Grundlage für die Bearbeitung dieser Einführung.

Begrifflich ist zwischen Insulin-Allergie und Insulin-Resistenz streng zu trennen. Mit Insulin-Allergie bezeichnet man im wesentlichen Hauterscheinungen allergischer Genese an den Insulin-Injektionsstellen, welche im folgenden noch näher zu erläutern sind. Liegt im Gegensatz dazu eine chronisch verminderte Insulinansprechbarkeit aufgrund von zirkulierenden neutralisierenden Insulin-Antikörpern vor (29), so spricht man von einer immunologisch bedingten Insulin-Resistenz.

Die häufigste Form der allergischen Hautreaktionen auf Insulin (Insulin-Allergie) ist die Reaktion vom verzögerten Typ (Spättyp).

Hierbei handelt es sich um eine gerötete und juckende, brennende oder stechende Schwellung im Bereich der Insulin-Injektionsstelle. Der Durchmesser beträgt in der Regel 3-5 cm, kann gelegentlich aber auch noch größer werden. Ihr Maximum erreicht die Reaktion vom Spättyp nach ca. 24 - 72 h. Sie tritt üblicherweise 6 - 10 Tage nach Beginn der Insulin-Injektionen auf. Erfolgte bereits früher eine Insulin-Behandlung, welche unterbrochen wurde, so kann dies zu einer Verkürzung des Intervalls führen. Immunologisch liegen dieser Reaktion zellständige Antikörper zirkulierender

Lymphozyten zugrunde. Eine lokale Antigenbindung in sehr großen Zellinfiltraten kann zu einer Herabsetzung der Insulin-Wirksamkeit führen. (12, 19, 27, 29)

Im Gegensatz zur Reaktion vom Spättyp steht die lokale allergische Reaktion vom Soforttyp, auch Frühreaktion genannt. Es handelt sich hier um eine urticarielle Reaktion, welche sich als Rötung und Quaddelbildung an den Injektionsstellen zeigt. Diese Erscheinung erreicht ihr Maximum bereits nach 10 - 15 min und kann im Gegensatz zur Spätreaktion nicht nur zu Beginn einer Insulintherapie, sondern auch nach längerer komplikationsloser Behandlungszeit auftreten. Im weiteren Vergleich neigt die seltenere Frühreaktion zu einer größeren Ausbreitung als die Reaktion vom Spättyp und es treten in manchen Fällen generalisierte Reaktionen wie z. B. eine ausgedehnte Urtikaria mit starkem Juckreiz, ein Quinke-Ödem oder ein lebensbedrohlicher anaphylaktischer Schock auf. Immunologisch basiert die Reaktion vom Soforttyp (Frühreaktion) auf zirkulierenden Antikörpern hauptsächlich vom Typ IgE, aber auch IgA und IgM. (12, 19, 27, 29)

Als sehr seltene und bezüglich der auslösenden Faktoren teilweise noch umstrittene Hautreaktion auf Insulin-Injektionen wird in der Literatur noch das Arthus Phänomen beschrieben. Hierbei imponieren Nekrosebildung am Ort der Injektion mit Induration und Ödem. Durch histologische Untersuchungen wird auf eine Pathogenese über Immunkomplexe hingewiesen. Zeitlich ist diese Form zwischen der Frühreaktion und dem Spättyp einzuordnen.

In den meisten der bisher beschriebenen Fällen konnten als ursächliche Faktoren Begleitstoffe bzw. Depotsubstanzen des Insulinpräparates als auch fehlerhafte intracutane Injektionstechniken nie ganz ausgeschlossen werden, so daß die Frage hinsichtlich der Ätiologie des Arthus Phänomens noch offen bleibt. (12, 29, 36, 41)

Als weitere äußerst seltene Hautreaktion im Rahmen einer Insulintherapie sollte noch die Lipoatrophie erwähnt werden. Sie wird als Folgeerscheinung von lokalen Entzündungsreaktionen bezeichnet (12). Durch Reeves (36) konnten Immunkomplexe in den Bindegewebsgefäßwänden nachgewiesen werden.

Neben den bereits genannten Erscheinungen werden gelegentlich noch andere allergische Reaktionen angegeben. So finden sich z. B. Beschreibungen über gastrointestinale Symptome, thrombozytopenische Purpura und Anämien, wobei auch hier die Frage nach der eindeutigen Ursache oft noch ungeklärt ist. Alle diese Reaktionen treten nur vereinzelt auf und sollen hier nicht näher erläutert werden. (19, 29)

Bezüglich der Häufigkeit der cutanen Insulin-Allergien finden sich in der Literatur äußerst unterschiedliche Angaben. Als Beispiel hierfür dient eine Zusammenstellung von Goldstein aus dem Jahre 1971 (13), in welcher sich je nach Autor für die Insulin-Allergie Häufigkeitsangaben von 1 % bis ca. 55 % finden. Bei Kahn und Rosenthal (19) wird unter Bezug auf die klinische Relevanz ein Anhaltswert von 5 % aller mit Insulin behandelten Diabetiker angeführt. Genauere Werte können hierzu jedoch nicht ermittelt werden.

Abschließend zur Thematik der Insulin-Allergie darf noch darauf hingewiesen werden, daß das Auftreten allergischer Hautreaktionen unter Insulin-Therapie nicht nur durch das Hormon selbst verursacht werden kann. So können z. B. durch Verunreinigungen aus dem Tierpankreas, durch galenische Begleitsubstanzen oder auch durch die Behandlungstechnik allergische Erscheinungen ausgelöst werden, was früher jedoch von größerer Bedeutung gewesen sein dürfte (29).

Im folgenden soll nun die Insulin-Resistenz näher besprochen werden. Wie inzwischen durch ausführliche Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, liegt die tägliche Ausschüttung von eigenem Insulin beim gesunden Erwachsenen im Bereich zwischen 20 und 60 E (19). Dies hat zur Folge, daß auch bei insulinabhängigen Diabetikern meist ein Hormonbedarf in diesem Bereich zu finden ist. Benötigt der Diabetiker eine höhere Insulin-Dosierung, so spricht man von verminderter Insulin-Ansprechbarkeit oder relativer Insulin-Resistenz. Zurückgehend auf Root 1929 (37) und Martin et al. 1941 (32) definierte man die Insulinresistenz als einen Tagesbedarf an Fremdinsulin von über 200 E bei einem nicht acidotischen Patienten über mindestens 48 h.

In der neueren Literatur so z. B. bei Federlin et al. 1971 (10) oder Daweke 1966 (7) spricht man bereits ab einem Tagesbedarf von über 100 E Fremdinsulin von einer Insulin-Resistenz.

Nach Kühnau (29) läßt sich die Insulin-Resistenz grundsätzlich in eine akute und eine chronische Form einteilen. Die akute Form beruht üblicherweise nicht auf einer immunologischen Reaktion, sondern tritt meist unter schweren Streßbedingungen wie z. B. nach größeren Verletzungen, Operationen, akuten Infekten oder auch psychischem Streß auf und verschwindet mit diesen auch wieder. Im Gegensatz dazu kann die chronische Insulin-Resistenz aufgrund zirkulierender Antikörper ohne erkenntlichen Grund gelegentlich schon nach wenigen Wochen einer Insulin-Behandlung, meist aber erst nach Monaten oder Jahren auftreten. Oft sind zur Kompensation des Stoffwechsels 80 - 150 E pro Tag noch ausreichend wie z. B. bei Federlin et al. (10) beschrieben. Daß der tägliche Insulinbedarf jedoch auch auf mehrere tausend Einheiten ansteigen kann, wird vom selben Autor anhand des Verlaufs der Insulin-Resistenz einer Diabetikerin demonstriert, welche zuletzt an die 40.000 E pro Tag benötigte.

Ein gern zitierter Fall eines extrem hohen Tagesbedarfs wurde von Tucker et al. beschrieben, wo der Patient täglich 177.500 E Insulin erhielt (50).

Wie schon bei der Insulin-Allergie finden sich auch bezüglich der Insulin-Resistenz in der Literatur je nach Autor unterschiedliche Häufigkeitsangaben.

Werte von 0,1 % der insulinbehandelten Diabetiker wie z. B. bei Daweke (7) für die antikörperbedingte Insulin-Resistenz angegeben, können zur groben Orientierung dienen. In jedem Fall darf von einer relativ seltenen Komplikation im Rahmen einer Insulin-Therapie gesprochen werden.

Bevor nun die Diagnose einer Insulin-Resistenz gestellt werden kann, ist differentialdiagnostisch noch an andere Ursachen zu denken.

So können z. B. Adipositas, chronische Infektionen, Leber- und Systemerkrankungen, endokrine Erkrankungen (z. B. Morbus Cushing, Hyperthyreose, Akromegalie, Phäochromozytom) als auch Injektionsfehler, mangelnde Kooperation mit chronischen Diätverstößen sowie die Einnahme antagonistischer Medikamente ebenfalls zu einer verminderten Hormonansprechbarkeit führen (7, 19, 29). Ein weiterer, in den letzten Jahren zunehmend mehr diskutierter Aspekt im Rahmen der Abklärung einer Insulin-Resistenz, ist die Fehlregulation auf der Basis des Insulin-Rezeptors. Wie in einer detaillierten Arbeit von Kahn 1980 (18) dargestellt, kann hierbei sowohl durch zahlenmäßigem Mangel an Rezeptoren, als auch durch Veränderungen der Rezeptoren-affinität (z. B. durch Antikörper gegen Insulinrezeptoren) eine verminderte Wirksamkeit des Insulins resultieren. Im gleichen Artikel werden zudem noch Störungen nachgeordneter Regulationsschritte (Post-Rezeptor-Defekte) mit in die Diskussion aufgenommen.

Um wieder zur eigentlichen Thematik, der Insulin-Resistenz durch zirkulierende Antikörper, zurückzukehren, abschließend noch einige Worte zum Pathomechanismus oben genannter Erkrankung. Wie inzwischen allgemein bekannt, entwickelt nahezu jeder insulinabhängige Diabetiker Antikörper gegen exogen zugeführtes artfremdes Hormon. Im wesentlichen handelt es sich hier um Immunglobuline der Klasse IgG, welche auch für die Entwicklung einer Insulin-Resistenz von herausragender Bedeutung sind. Zu Beginn einer Insulin-Therapie konnten darüberhinaus IgM-Antikörper nachgewiesen werden. In seltenen Fällen einer Insulin-Resistenz wurde noch IgD gefunden, die Immunglobuline der Klassen IgE und IgA spielen, wie schon erwähnt, hauptsächlich im Rahmen der Insulin-Allergie eine Rolle. (12, 19)

Bei Patienten mit einer Insulin-Resistenz sind die beschriebenen Antikörper (vornehmlich IgG, s.o.) so stark erhöht, daß aufgrund der vermehrten Insulinbindung im Serum wesentlich höhere Insulindosen benötigt werden, um die gewünschten Stoffwechseleffekte zu erreichen. Wenn auch die Wirksamkeit des an die Antikörper gebundenen Insulins aufgehoben wird, so erfolgt dadurch jedoch keine Zerstörung des Moleküls, sondern es besteht vielmehr ein Schutz vor enzymatischem Abbau (29).

Berson und Yalow konnten 1959 (2, 3) bei Insulin-Antikörpern zwei verschiedene Bindungsstellen, davon eine vom Typ AK 1 mit hoher Affinität und geringer Kapazität und eine andere vom Typ AK 2 mit geringer Affinität und hoher Kapazität nachweisen. Antikörper vom Typ AK 1 sind für die Insulin-Resistenz von wesentlich größerer klinischer Relevanz als der Typ AK 2. So fanden Kerp et al. 1968 (25) eine enge Korrelation zwischen täglichem Insulinbedarf und Antikörpern die das Insulin mit großer Festigkeit und hoher Reaktionsgeschwindigkeit binden (Typ AK 1), während für den weniger fest bindenden und langsamer reagierenden Antikörper (Typ AK 2) diese Korrelation nur in schwächerer Form gezeigt werden konnte.

C: Material und Methoden

I. Allgemeine Hinweise

Die Experimente zu dieser Arbeit wurden im wesentlichen zwischen Mai 1981 und Juni 1983 am Institut für Chirurgische Forschung durchgeführt. (Ausnahmen werden gesondert angegeben.)

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von der Firma Merck / Darmstadt bezogen.

II. Tiermodell

Als Tiermodell dienten "high responder" Balb / C Mäuse. Die Versuchstiere wurden im Alter von sechs bis acht Wochen vom Zentralinstitut für Versuchstierkunde in Hannover gekauft und bei künstlichem Licht in Sammelkäfigen zu fünf bis sieben Tieren gehalten. Trockenfutter (Firma Altromin/Lippe) und Trinkwasser standen ausreichend zur Verfügung.

Aus Gründen der Tierhaltung wurden ausschließlich weibliche Mäuse für die Experimente verwendet (Aggressivität der Männchen).

Die Tiere wurden im Alter von acht bis sechzehn Wochen in den Versuch genommen.

III. Antigene und Tolerogene

1. Insuline

Für die Immunisierung der Tiere wurde ausschließlich Des-Gly^{A1}-, des-Phe^{B1}-Insulin vom Rind (5) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein modifiziertes Insulin-derivat, bei welchem die letzten beiden Aminosäuren abgespalten wurden, was die blutzuckersenkende Wirkung auf ca. 1 % reduziert, die antigenen Eigenschaften jedoch voll erhält. Auf diese Weise wurde eine hypoglykämische Reaktion der Tiere nach Immunisierung mit den relativ hohen Mengen Insulin (siehe unten) verhindert.

Das Derivat wurde von Professor Brandenburg vom Deutschen Wollforschungsinstitut Aachen freundlicherweise für die Versuche zur Verfügung gestellt.

In vitro (Kodierung der Erythrozyten beim haemolytischen Plaque-Test, Darstellung der PVP-Insulin-Konjugate) wurde kristallines Insulin der Firma Hoechst AG vom Rind (CR) oder vom Schwein (CS) verwendet.

2. PVP-Insulin-Konjugate

Es wurden jeweils 4 verschiedene PVP-Insulin-Konjugate vom Rind und vom Schwein hergestellt. Vergleiche hierzu auch (46, 53). Aktiviertes Poly(N-vinylpyrrolidon) (PVP) wurde mit citraconyliertem Rinder- bzw. Schweineinsulin versetzt. PVP wurde jeweils in 5-, 10- und 20-fachem Überschuß hinzugegeben.

Durch die Protektion der N-terminalen Aminosäurenreste der A- und B-Kette mit Citraconsäureanhydrid wurden biologisch aktive PVP-Insuline erhalten.

Die Reinigung der verschiedenen PVP-Insulin-Konjugate erfolgte zunächst durch Dialyse gegen destilliertes Wasser, dann durch Ultrafiltration mit Amicon PM 30 Membranfiltern und schließlich durch Gelfiltration auf einer Sephadex G 100-Säule, die mit 3-molarer Essigsäure äquilibriert worden war.

Nähere Angaben sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

IV. Immunisierung und Messung der Serumantikörperaktivität

Die Immunisierung der Tiere erfolgte, wie oben schon erwähnt, mit Des-Gly-, des-Phe-Insulin. Hierbei wurden den Mäusen, sofern nicht anders angegeben, je 100 µg Insulinderivat intraperitoneal injiziert. Das kristalline Insulin wurde hierfür durch Zugabe von einigen Tropfen 0,1 normaler NaOH in Aqua dest. gelöst und im Verhältnis 1:2 mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) vermischt (Firma Behring). Ein Tier erhielt jeweils 0,2 ml der kompletten Lösung.

Zur Bestimmung der Insulin-Antikörperaktivität des Serums wurde den Mäusen nach einem bestimmten Intervall (siehe Ergebnisteil) aus der Schwanzvene Blut entnommen.

Die Tiere wurden hierfür mit einer Infrarotlampe für ca. 5 min erwärmt. Nach Anritzen des Schwanzes mit einem Skalpell erfolgte die Entnahme (Abtropfen in vorbereitete Röhrchen) von 20 Tropfen Venenblut pro Tier. Nach Abschluß der Gerinnung wurde das Serum durch Zentrifugation bei 3000 U/min (Zentrifuge: Hettich Rotanta K) gewonnen. Serum von Tieren gleicher Gruppe wurde gepoolt. Die Konservierung des Mäuseserums erfolgte durch Einfrieren bei -20°C .

Um die Insulin-Antikörper zu bestimmen, mußte ein Farr-Typ-Hapten-Bindungstest mit ^{125}J -Insulin durchgeführt werden, dessen Prinzip unter Literaturstelle (16) zu finden ist.

Die eigentliche Durchführung des Bindungstestes erfolgte durch Professor Kolb am Klinisch-Chemischen Institut des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching.

10 μl Probe (Serum) wurden zunächst mit 10 μl ^{125}J -Insulin 24 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ inkubiert, anschließend wurde die Immunglobulinfraction durch Zugabe des gleichen Volumens an gesättigtem Ammoniumsulfat gefällt, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Der Niederschlag wurde einmal mit 50 %igem Ammoniumsulfat gewaschen. Nach abermaligem Absaugen konnte die Radioaktivität im Präcipitat in einem γ -Zähler gemessen werden.

Die Radioaktivität im Niederschlag wird auf die Gesamtmenge (100 %) an zugegebener Radioaktivität in % bezogen.

V. Lymphozytentransformationstest LTT

Im LTT wurde die durch Antigenbehandlung erzielte Steigerung der Mitoserate in einer zu untersuchenden

Milz-Zellpopulation von vorbehandelten Tieren bestimmt. Zur spezifischen Stimulation wurden im vorliegenden Fall Insuline vom Rind und vom Schwein (gelöstes Insulin Hoechst) in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Gemessen wurde der Einbau eines radioaktiv markierten Nucleosids (^3H -Thymidin) in die Zellkerne; aus dem Vergleich mit einer nicht antigenbehandelten Kontrollpopulation konnte die Mitosesteigerung direkt berechnet werden. Am Versuchstag wurden den Tieren unter sterilen Kautelen die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen (vgl. VI.3.) in RPMI 1640 hergestellt (Fa. Gibco; Zusätze: 1 % MEM Vitaminlsg., 1 % MEM nicht essentielle Aminosäuren, 100 E/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fungizone, 20 mmol/l Hepes Puffer). Jeweils 0,2 ml der homogenen Milzlymphozytensuspension ($C = 2,4 \times 10^6/\text{ml}$) wurden pro well auf Mikrotiterplatten auspipettiert (Firma Nunc/Denmark, U-Shape). Nach Zugabe von 0,02 ml der entsprechenden Insulinlösung und Zusatz von 1 % isologem Mausserum wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. 4 Tage später erfolgte die Zugabe von 0,02 ml einer 1:10 Verdünnung von ^3H -markiertem Thymidin (Amersham Buchler, spez. Aktivität 1 mCi/ml, auf der Mikrotiterplatte 2 μCi per well). 18 Stunden danach wurden die Platten zur Beendigung der Mitose bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen konnten die Zellen maschinell geerntet werden (Mash II, Dynatech / Plochingen). Die Kerne wurden auf Glasfaser Filtern (Firma Whatman, New Jersey) gesammelt und nach Trocknung und Zugabe von Szintillationsflüssigkeit im Tri. carb. liquid. scintillation spectrometer (Firma Packard) die eingebaute Radioaktivität gemessen.

VI. Hämolytischer Plaque-Test

(modifiziert nach Jerne)

1. Kopplung von Insulin an Erythrozyten

Für die erfolgreiche Durchführung des haemolytischen

Plaque-Tests (nach Jerne) war es zunächst notwendig, das Antigen Insulin an die Erythrozytenoberfläche zu koppeln.

Es wurde anfangs versucht mit konventionellen Methoden, so z. B. mit Chromchlorid oder mit Tanninsäure, dieses Ziel zu erreichen. Hierbei wurde festgestellt, daß die üblichen Verfahren Proteine an Erythrozyten zu koppeln bei Insulin fehlschlagen. (Gründe sind der Diskussion zu entnehmen.)

Es mußte deshalb auf eine relativ schwierige Methode nach Joyce A. Schroer et al. (42) zurückgegriffen werden.

Dabei bedient man sich zweier bifunktionaler Reagenzien:

- Methyl-4-mercaptobutyrimidate (MBI)
- und - m-Maleimidobenzoyl N-hydroxysuccinimide-ester
(MBS)

Diese beiden Stoffe wurden von der Firma Sigma bezogen.

Im folgenden sollen die Kopplungsschritte kurz dargestellt werden.

(Vergleiche hierzu Schema Nr. 1).

Im ersten Reaktionsschritt reagiert MBI mit den **ε** Aminogruppen von Lysinresten aus Proteinen der Erythrozytenoberfläche.

In einem separaten Reaktionsschritt alkyliert MBS über seine reaktive N-hydroxysuccinimide-ester-Gruppe Aminogruppen des Insulinmoleküls.

Gibt man nun die beiden Komponenten MBS-Insulin und MBI-Erythrozyten zusammen, so verbinden sich diese beiden über eine Schwefelesterverbindung und man erhält insulinkonjugierte Erythrozyten.

Für die technische Durchführung der Insulinkopplung an Erythrozyten nach J. A. Schroer et al. (42) wurden

folgende Reagenzien hergestellt:

1. Bicine-Kochsalz-Puffer
(0,02 M bicine, 0,01 M NaOH,
0,15 M NaCl, pH 8,3)
2. Bicine-Puffer
(0,1 M bicine, 0,05 M NaOH, pH 8,3)
3. Zitrat-Phosphat-Puffer
(1,0 M Zitronensäure, 1,0 M $K_2 HPO_4$, pH 5,3)
4. Verdünnter Zitrat-Phosphat-Puffer
(Nr. 3 1:100)
5. Phosphat-Puffer
(0,078 M NaCl, 0,056 $Na_2 HPO_4$,
0,016 M $KH_2 PO_4$, pH 7,2)

Ferner wurden noch Dimethylformamid und Hammelerythrozyten (SRBC = sheep red blood cells, bezogen von GSF Neuherberg) verwendet.

Darstellung der einzelnen Schritte:

9 ml gepackte SRBC wurden dreimal in 50 ml Bicine-Kochsalz-Puffer gewaschen. Hierauf erfolgte die Zugabe von 63 mg MBI zu den 9 ml SRBC (in 27 ml Puffer).

Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln wurden die MBI - SRBC nach abermaligem dreimaligen Waschen mit Bicine-Kochsalz-Puffer in 24 ml Puffer wiederaufgenommen und vor Zugabe von MBS-Insulin nicht länger als 30 min aufbewahrt.

18 mg Schweineinsulin gelöst in 3 ml Bicine-Puffer wurden unter sofortigem Schütteln zu 9 mg MBS gelöst in 3 ml Dimethylformamid gegeben.

Für Insulin und MBS war bei Raumtemperatur und

gelegentlichem Rühren eine Reaktionszeit von 2 Stunden notwendig.

Nach Präzipitation des Insulins durch Zugabe von ca. 10 ml Zitrat-Phosphat-Puffer und Zentrifugation bei ca. 2000 x g für 10 min erfolgten nochmals zwei Waschschrirte mit verdünntem Zitrat-Phosphat-Puffer und Zentrifugation bei ca. 4000 x g für 10 min. Der Niederschlag (MBS-Insulin) wurde in 3 ml Bicine-Kochsalz-Puffer gelöst und zu den MBI-Erythrozyten gegeben:

Im Anschluß an eine Reaktionszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur und gelegentlichem Schütteln sowie nach dreimaligem Waschen der insulinkonjugierten SRBC in Phosphat-Puffer erfolgte die weitere Aufbewahrung im selben Puffer bei 4-6°C.

Nach Angaben von J.A. Schroer et al. (42) beträgt die Stabilität der insulinkonjugierten SRBC mindestens 1 Monat.

Für die im weiteren beschriebenen Versuche wurden die konjugierten Erythrozyten (SRBC) vor Verwendung jedoch nur maximal 8 Tage aufbewahrt, da bei älteren Erythrozyten eine gesteigerte Haemolyse und Verklumpung beim Plaque-Test beobachtet wurde.

2. Benötigte Reagenzien und Materialien

Für den haemolytischen Plaque-Test (modifiziert nach Jerne) wurden folgende Reagenzien und Materialien verwendet:

- Gelatine-Barbitalpuffer:

100 mg Gelatine reinst gelöst in 20 ml	
20 ml Aqua bidest	20 ml
Barbitalpufferlösung	20 ml
2 molare $MgCl_2$ -Lösung	0,05 ml
0,3 molare $CaCl_2$ -Lösung	<u>0,05 ml</u>
Aqua bidest	ad 100 ml

- Barbitalpufferlösung:
NaCl 41,5 g
Na-Barbital 5.095 g
Aqua bidest 1000 ml
eingestellt mit 5 N HCl auf pH 7,5
- Agar purum (Behring Institut)
- Agarose (Firma IBF, Clichy, France)
- Meerschweinchen-Komplement (Behring Institut)
- Antiseren Anti-Maus-Ig (Firma DAKO)
Anti-Maus-IgG Subklassen (Firma Miles)
- Petrischalen aus Kunststoff (Firma Greiner)
- Hank'sche Lösung (Klinikapotheke; Zusatz: 20 $\mu\text{mol/l}$ Hepes Puffer)

3. Zellgewinnung

Die Zellgewinnung erfolgte nach folgender Methode:
Nach Tötung der Tiere im Äthertopf wurden unter aseptischen Bedingungen die Milzen der Mäuse entnommen und grob von den anhaftenden Fett- und Bindegewebsresten befreit. Durch Ausstreichen der Zellen aus der Milzkapsel mit Kanülen (0,9 mm Sterikan, Firma B. Braun Melsungen) in Hank'scher Lösung (Klinikapotheke) wurden Einzelzellsuspensionen angefertigt (Zimmertemperatur). Zur Entfernung von Zellaggregaten diente die Filterung der Suspensionen durch Nylon-Gitternetze (Nr. 9xxx, Typ 326, Faserdurchmesser 90 Mikrometer, Schweizer Seidengaze Fabrik AG, Thal / Schweiz).

Nach 3-maligem Waschen in Hank'scher Lösung konnten die Zellsuspensionen auf bestimmte Zellkonzentrationen eingestellt werden (in Hank'scher Lösung). Die Zählung erfolgte mit 1%igem Eosin oder mit Türk'scher Lösung in Neubauer Zählkammern.

Alle Wasch und Filterschritte wurden in Polypropylenröhrchen (50 ml, Falcon Oxnard USA), die Anfertigung der Einzelzellsuspension in Petrischalen (Firma Greiner /Nürtingen) durchgeführt. Die Aufbewahrung der eingestellten Zellsuspensionen erfolgte in 10 ml-Röhrchen (Firma Greiner).
Sofern nicht anders erwähnt, wurden Milzzellen gleicher Gruppe gepoolt. (Vgl. Ergebnisteil)

4. Durchführung

Vergleiche hierzu Schema Nr 2 und Nr 3

Im ersten Schritt wurde zunächst in Petrischalen eine Grundschrift bestehend aus 4 ml 2%igem Agar purum in Hank'scher Lösung gegossen. Nach Erkalten des Agars wurden die Petrischalen mit dem Deckel nach unten in Plastikkkästen bei 4 - 6 °C aufbewahrt.

Die Vorbereitung der Grundschrift erfolgte einen Tag vor der Durchführung des Tests.

Für den zweiten Schritt wurde eine 0,6%ige Agarose Lösung vorbereitet und nach Zugabe von 0,75 mg/ml DEAE Dextran (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) im Wasserbad bei 42 °C gehalten.

Im Anschluß daran konnten in ebenfalls im Wasserbad (42 °C) stehende Eppendorf-Röhrchen jeweils 0,3 ml 0,6 % Agarose pipettiert werden (Pipetten der Firma Gilson).

Hierauf wurden einzeln und nacheinander zugegeben:

- 0,1 ml Milzzellsuspension (Konzentration siehe Ergebnisteil)
und

- 0,025 ml 30 %ige insulinkonjugierte Hammelerythrozyten (SRBC)

Jedes Röhrchen mußte sofort aus dem Wasserbad genommen,

der Inhalt kurz gemischt und mit einer Glaspipette auf die Agargrundschrift der vorgewärmten Petrischalen gegeben werden. Durch vorsichtiges Ausrotieren erfolgte eine gleichmäßige Verteilung der Deckschicht auf der Agargrundschrift.

Nach Beschichtung aller benötigten Petrischalen und Erkalten der Deckschicht wurde noch 1 ml Anti-Maus-Ig-Serum in einer Verdünnung von 1:100 (in Gelatine-Barbital-Puffer) hinzugegeben oder für die Bestimmung der "direkten" PFC (siehe Ergebnisteil) lediglich 1 ml Puffer.

Anschließend konnten die Petrischalen zunächst für 1,5 h im Brutschrank bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 5 % inkubiert werden. In dieser Phase spielen sich folgende Reaktionen ab: (siehe Schema Nr. 3)

Ein Teil der in der Deckschicht vorhandenen Milz-lymphozyten erkennt das an die Erythrozyten gekoppelte Insulin als Fremdanigen und reagiert hierauf mit einer Sezernierung von insulinspezifischen Antikörpern.

Diese Antikörper diffundieren in die Umgebung der einzelnen Zellen und binden an das Insulin auf der Erythrozytenoberfläche. Die hinzugegebenen Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper (für den "indirekten" Plaque-Test) binden nun ebenfalls wieder an die insulinspezifischen Antikörper, so daß ein größerer Antigen-Antikörperkomplex an der Erythrozytenoberfläche entsteht. Dieser Komplex ist nun in der Lage, das nach 1,5 h hinzugegebene Komplement (1:8 verdünnt in Pufferlösung) soweit zu aktivieren, daß eine Haemolyse der mit Antikörperkomplexen beladenen Erythrozyten erfolgt, welche (nach einer weiteren Inkubation von 1h) in Form von Haemolyse-Plaques um die einzelnen sezernierenden Zellen herum deutlich sichtbar wird.

Haemolytischer Plaque-Test

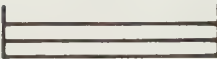
1



Grundschrift: 4 ml Agar purum (2 %)



2



Deckschicht: 0,3 ml Agarose (0,6 %)

0,1 ml Zellsuspension

(2×10^7 /ml)

0,025 ml Erys (30 %)



+ Antiserum 1:100

3



1,5 h inkubieren 37°C

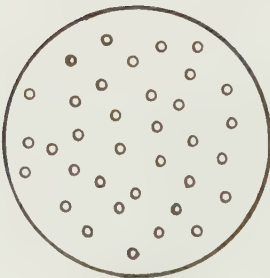
+ Komplement 1:8

4



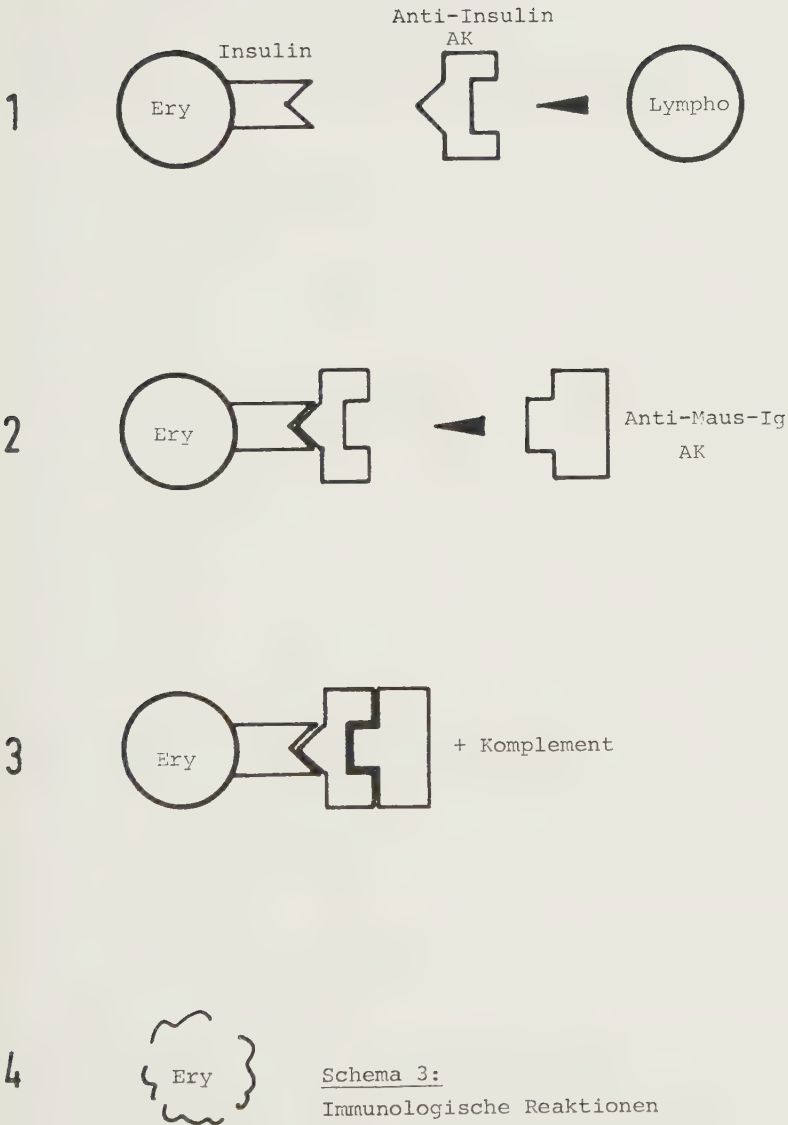
1,0 h inkubieren 37°C

5



Schema 2:

Durchführung des haemolytischen
Plaque-Tests



Schema 3:

Immunologische Reaktionen
beim haemolytischen Plaque-Test

Hämolyse

Werden IgM-Antikörper sezerniert, so ist die Zugabe von Antiserum nicht nötig, da der relativ große IgM-Antikörper allein in der Lage ist Komplement zu aktivieren ("direkter" Plaque-Test).

Die Haemolyse-Plaques lassen sich im Durchlicht gut auszählen.

Da praktisch jeder antikörpersezernierenden Zelle ein Plaque entspricht, läßt sich auf diese Weise die Zahl der spezifischen Zellen ermitteln.

Um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten, wurden für jede Gruppe zwischen 4 und 6 Petrischalen beschichtet.

Weitere Angaben sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

VII. Zelltransfer

Bei den Zelltransferexperimenten erfolgte eine Übertragung von Milzzellen vorbehandelter Tiere in bestrahlte Empfänger. Die Empfängertiere (Stamm Balb/C) wurden im Alter von 6 - 8 Wochen von der Gesellschaft für Strahlenforschung (GSF) / Neuherberg bezogen und sofort in den Versuch genommen. Durch Bestrahlung mit 600 rad (Cs 137) sollte eine Knochenmarkssuppression der Empfängertiere erreicht werden.

Durchgeführt wurde die Bestrahlung ebenfalls durch die GSF / Neuherberg.

Die Herstellung der Zellsuspensionen für den Transfer wurde von der Methode her, wie unter VI.3. beschrieben, durchgeführt. Zusätzlich mußte lediglich auf die Sterilität der Zellen geachtet werden.

Die einzelnen Aufbereitungsschritte erfolgten deshalb unter sterilen Kautelen (Laminaflow, sterile Bestecke und Materialien, sorgfältige Desinfektion der Tiere mit Kodan^R).

Nach den einzelnen Waschschritten mit Hank'scher Lösung wurden die Zellen in RPMI 1640 (Firma Gibco) aufgenommen.

Nach Einstellen auf die erforderlichen Konzentrationen (Zählung in Neubauerkammer etc.) konnten die Zellsuspensionen in 2 ml-Einmalspritzen aufgezogen und anschließend in die Empfängertiere intraperitoneal injiziert werden (pro Tier 0,5 ml Volumen). Am darauffolgenden Tag wurden die Tiere mit 100 µg Des-Gly-, des-Phe-Insulin immunisiert.

Nach Ablauf von weiteren 8 Tagen erfolgte die Blutentnahme aus der Schwanzvene und zu einem späteren Zeitpunkt die Bestimmung der Serumaktivität gegenüber Insulin (vgl. hierzu auch C.IV.).

Genauere Angaben über Vorbehandlung der Spender-tiere, Versuchsaufbau und zeitlichen Ablauf sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

D: Ergebnisse

I. Nähere Charakterisierung der hergestellten

PVP-Insulin-Konjugate

Um die einzelnen PVP-Insulin-Konjugate näher charakterisieren zu können, wurde bei dem bereits unter Material und Methoden angesprochenem Herstellungsverfahren neben nativem Insulin auch radioaktives ^{125}J -Jod-Insulin zugesetzt. Abb. 1 und Abb. 2 zeigen die Elutionskurven von ^{125}J -markiertem PVP-Insulin Rind und PVP-Insulin Schwein bei der Gelfiltration durch eine Sephadex G 100 Säule, welche den letzten Reinigungsschritt bei der Herstellung darstellt.

Der frühe hohe Peak entspricht dem PVP-Insulin-Konjugat mit Molekulargewichten von 50.000 bis 60.000 (46). Der rechte kleinere Peak entspricht unverändertem Rinderinsulin (MG 5733) bzw. unverändertem Schweineinsulin (MG 5727). Aufgetragen sind auf der Abszisse jeweils die Fraktionen, auf der Ordinate die Impulse / min. Chromatographiert man die unter dem ersten Peak gelegenen Fraktionen erneut, so erhält man nur noch einen einzigen Peak, welcher reinem PVP-Insulin entspricht, was darauf hinweist, daß kein "Leaking" von freiem Insulin aus dem PVP-Insulin-Konjugat erfolgt, wie es z. B. bei Sepharose-gekoppeltem Insulin bekannt ist (6).

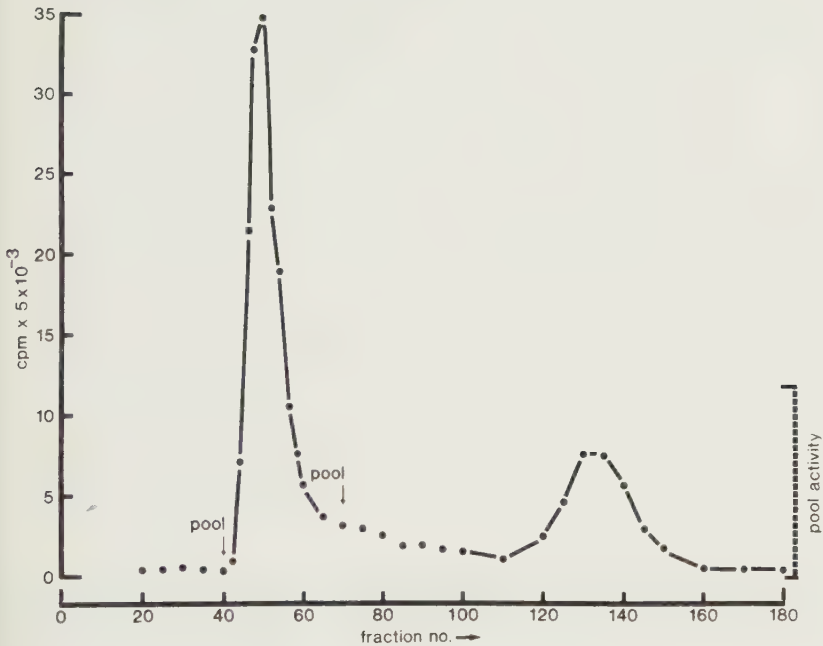


Abb.1: Elutionskurve des PVP-Insulins vom Rind, markiert mit ¹²⁵J-Insulin (Insulingehalt 7,7 %). Trennung auf einer Sephadex G 100 Säule, äquilibriert mit 3-molarer Essigsäure.

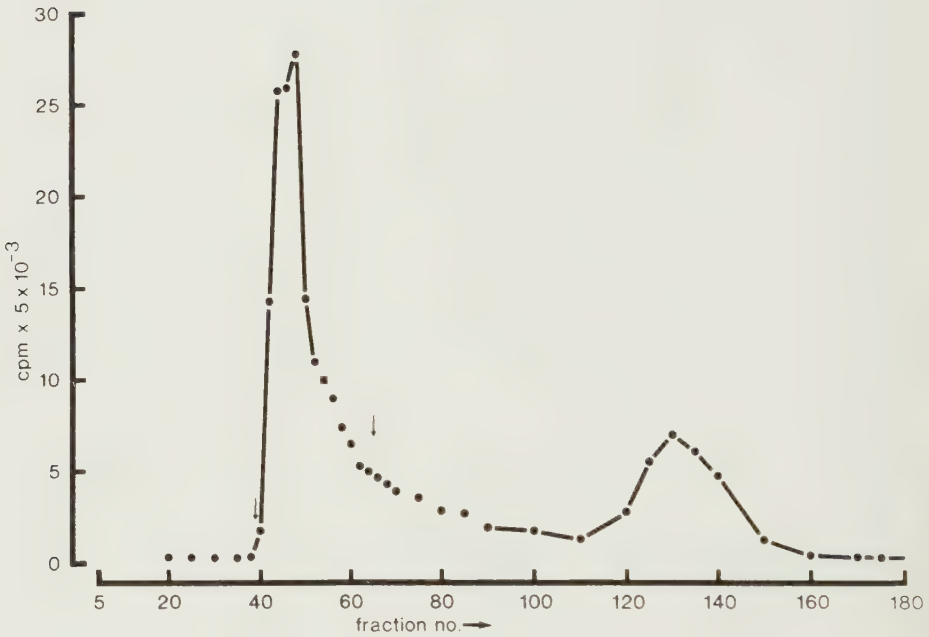


Abb. 2: Elutionskurve von ^{125}J -markiertem PVP-Insulin vom Schwein (Insulin S-Gehalt 8,3 %).

Der Insulingehalt der einzelnen PVP-Insulin-Konjugate wurde errechnet aus der Radioaktivität von 5 mg PVP-Insulin und der Aktivität eines Aliquots der Ausgangslösung von bekanntem Insulingehalt. Den Insulingehalt der einzelnen PVP-Insulin-Verbindungen verdeutlicht Tabelle 1, wobei der Insulingehalt mit zunehmendem PVP-Gehalt der Ausgangslösung abnimmt.

In gleicher Weise verringert sich die Antigenizität der PVP-Insulin-Konjugate, die radioimmunologisch ermittelt wurde, mit zunehmendem PVP-Anteil.

PVP-Insulin-Konjugat	1:5	1:10	1:15	1:20
PVP-Überschuß	5 x	10 x	15 x	20 x
Gehalt an Insulin R	9,7 %	7,7 %	5 %	3 %
Antigenizität	7,2 µg/mg	1,8 µg/mg	0,4 µg/mg	0,1 µg/mg
Gehalt an Insulin S	13,7 %	8,3 %	6,5 %	4,2 %
Antigenizität	12,8 µg/mg	2,3 µg/mg	0,3 µg/mg	0,1 µg/mg

Tab. 1

Rinderinsulin (Insulin R)- und
Schweineinsulin (Insulin S)-Gehalt
der PVP-Insulin-Konjugate und ihre
Antigenizität

II. Vergleich der verschiedenen PVP-Insulin-Konjugate in ihrer Wirkung auf die primäre Immunantwort gegenüber nativem Insulin

Die Tiere wurden in Gruppen von jeweils 7 Mäusen in den Versuch genommen. Die Vorbehandlung verlief nach folgendem Schema:

- Tag 0: Intraperitoneale Injizierung von PVP(Vergleichsgruppe) oder PVP-Insulin-Konjugat (vergleiche hierzu Tab. 2).
- Tag 1: Immunisierung der Tiere mit Des-Gly-, des-Phe-Insulin in CFA i.p.
- Tag 15: Blutentnahme und Serumgewinnung.

Die Blutentnahme erfolgte aus der Schwanzvene der Tiere, Nach Zentrifugation bei 3000 U/min wurde das Serum abpipettiert und bei -20 °C eingefroren.

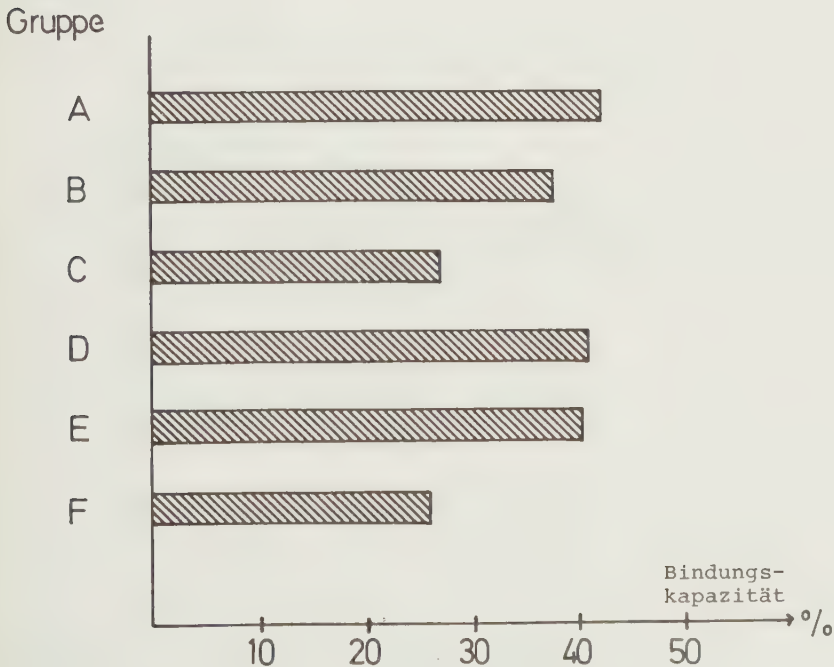
Serum von Tieren gleicher Gruppe wurde gepoolt. Die Bestimmung der Insulin-Antikörperaktivität des Mäuseserums durch den Farr-Typ-Hapten-Bindungstest wurde zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt. Dabei wurde das Serum zunächst mit 125-J-Insulin inkubiert. Nach anschließender Ausfällung der Immunglobulinfraktion und Zentrifugation sowie einem Waschschrift konnte die Radioaktivität im Präzipitat in einem γ -Zähler gemessen werden. Die Radioaktivität im Niederschlag wird auf die Gesamtmenge an zugegebener Radioaktivität in % bezogen (vgl. auch Material und Methoden).

Tab. 2 zeigt den Vergleich der 4 verschiedenen PVP-Insulin-Konjugate vom Schwein (PVP-Ins. S) in ihrer Wirkung auf die primäre Immunantwort gegenüber nativem Insulin.

Es werden jeweils Doppelwerte und dazugehöriger Mittelwert der Insulin-Antikörperaktivität des Mäuseserums in % angegeben (entspricht % Tracer-Bindung).

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse in Abb.3 graphisch dargestellt.

Gruppe	n	1. Behandlung	2. Behandlung	% Insulin-Antikörper-aktivität d. Serums	M
A	7	0,2 ml PBS		42/43	42,5
B	7	500 µg PVP	100 µg	37/39	38
C	7	500 µg PVP-Insulin S 13,7 % Insulin S	Des-Gly- des-Phe-	31/23	27
D	7	500 µg PVP-Insulin S 8,3 % Insulin S	Insulin in CFA	40/42	41
E	7	500 µg PVP-Insulin S 6,5 % Insulin S		43/38	40,5
F	7	500 µg PVP-Insulin S 4,2 % Insulin S		26/26	26



Tab.2 und
Abb. 3:

Wirkung der PVP-Insulin-Konjugate vom Schwein auf die primäre Immunantwort gegenüber nativem Insulin. Insulin-Antikörperaktivität des Serums in % Bindungskapazität gegenüber markiertem Insulin.

Wie aus den Ergebnissen zu entnehmen ist, bewirken zwei der vier eingesetzten PVP-Insulin-Konjugate vom Schwein eine deutliche Reduktion der Immunantwort gegenüber nativem Insulin.

Zieht man Gruppe B, welche nur mit unverändertem PVP vorbehandelt wurde, als Referenzgruppe heran, so reduziert sich die Anti-Insulin-Immunantwort bei Gruppe C durch einmalige Gabe von PVP-Insulin S (13,7 % Insulin S im Konjugat) um 29 % des Vergleichswerts.

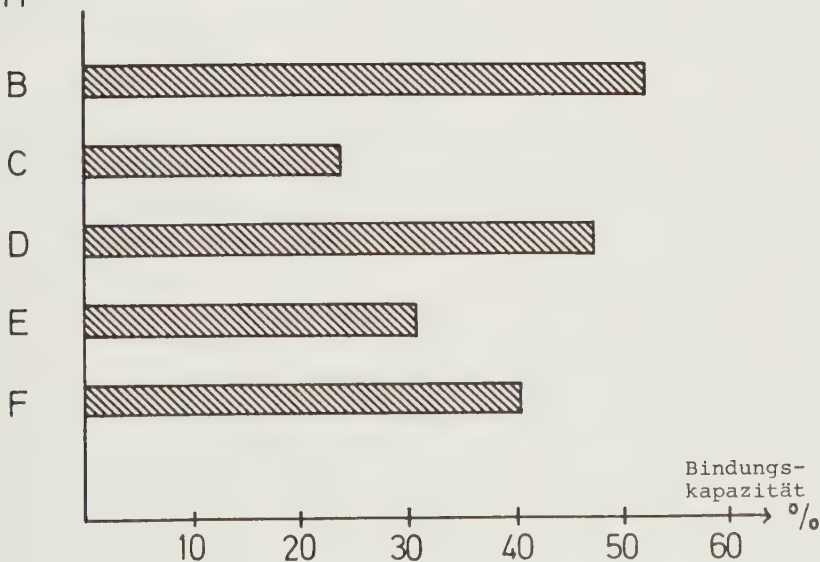
Gruppe F, welche ein anderes PVP-Insulin-S-Konjugat (mit 4,2 % Ins. S im Konjugat) erhalten hatte, weist eine Reduktion der Anti-Insulin-Immunantwort um 32 % des Vergleichswertes auf.

Bei den restlichen zwei PVP-Ins. S-Konjugaten (Gruppe D und Gruppe E) lassen sich hier keine Effekte auf die Anti-Insulin-Immunantwort nachweisen.

Tabelle 3 und Abb. 4 zeigen den Vergleich der PVP-Insulin-Konjugate vom Rind (PVP-Ins. R) in ihrer Wirkung auf die Immunantwort gegenüber nativem Insulin. Versuchsaufbau und -ablauf blieben unverändert; auf die PBS-Gruppe (Gr. A) als zusätzliche Kontrolle wurde verzichtet.

Gruppe	n	1. Behandlung	2. Behandlung	% Insulin-Antikörperaktivität d. Serums	M
B	7	500 µg PVP		53/52	52,5
C	7	500 µg PVP-Insulin R 9,7 % Insulin R	100 µg Des-Gly-	24/24	24
D	7	500 µg PVP-Insulin R 7,7 % Insulin R	des-Phe- Insulin	47/48	47,5
E	7	500 µg PVP-Insulin R 5,0 % Insulin R	in CFA	29/33	31
F	7	500 µg PVP-Insulin R 3,0 % Insulin R		38/43	40,5

Gruppe



Tab. 3 und
Abb. 4:

Wirkung der PVP-Insulin-Konjugate vom Rind auf die primäre Immunantwort gegenüber nativem Insulin. Insulin-Antikörperaktivität des Serum in % Bindungskapazität gegenüber markiertem Insulin.

Auch hier weisen zwei der vier eingesetzten PVP-Insulin-Konjugate eine deutliche Reduktion der Immunantwort gegenüber nativem Insulin auf.

Im Vergleich zur Referenzgruppe (Gruppe B), welche nur unverändertes PVP erhalten hatte, reduziert sich bei Gruppe C die Anti-Insulin-Immunantwort durch einmalige Gabe von PVP-Ins. R (9,7 % Ins. R im Konjugat) um 54 % des Vergleichswertes. Gruppe E (behandelt mit PVP-Ins. R mit 5 % Ins. R im Konjugat) zeigt eine Reduktion um 41 %.

Eine Senkung der Insulinantikörperaktivität des Serums konnte im Rahmen dieses Versuches auch bei den anderen, verbleibenden PVP-Ins.-R-Konjugaten (Gruppe D und F) nachgewiesen werden. Die Effekte waren hierbei jedoch geringer ausgeprägt als bei den oben genannten PVP-Ins.-R-Konjugaten.

Zusammenfassend läßt sich folgende Aussage treffen:

Sowohl bei den vier PVP-Ins.-Konjugaten vom Schwein, als auch bei den Konjugaten vom Rind reduzieren jeweils zwei der unterschiedlichen PVP-Insuline die Anti-Insulin-Immunantwort (gemessen in % Insulinantikörperaktivität des Serums) im Vergleich zu den Referenzgruppen deutlich (bis max. 54 %).

Eine genauere Bewertung der Ergebnisse sowie daraus entstehende Schlußfolgerungen sind der Diskussion zu entnehmen.

III. Wirkung von PVP-Insulin auf die sekundäre Immunantwort gegenüber nativem Insulin

Es wurden ebenfalls wieder 7 Tiere pro Gruppe in den Versuch genommen. Die eigentliche Versuchsdauer erstreckte sich hier über 26 Tage:

- Tag 0: Immunisierung mit Des-Gly-, des-Phe-Insulin in CFA intraperitoneal
- Tag 14: Serumgewinnung zur späteren Bestimmung Insulin-Antikörperaktivität
- Tag 15: Injizierung von PVP (Referenzgruppe) oder PVP Insulin-Konjugat (PVP-Ins. Rind mit 3 % Ins. R)
- Tag 17: Reimmunisierung mit Des-Gly-, des-Phe-Insulin in CFA i.p.
- Tag 25: Erneute Serumgewinnung zur späteren Bestimmung der Insulin-Antikörperaktivität

Im Rahmen dieses Experiments wurden jeweils zwei 7er Gruppen gleich behandelt. Serum von Tieren gleicher Gruppe wurde gepoolt. Die Bestimmung der Insulin-Antikörperaktivität des Mäuseserums erfolgte wieder mittels des Farr-Typ-Bindungstestes, wie unter Material und Methoden beschrieben.

Abb. 5 veranschaulicht die Ergebnisse.

Den Erwartungen entsprechend war die Insulin-Antikörperaktivität des Mäuseserums aufgrund des Boostereffektes am Tag 25 wesentlich höher als am Tag 14 vor erfolgter Reimmunisierung.

Zur besseren Darstellung der Ergebnisse wird deshalb jeweils nur die Differenz der Mittelwerte zwischen beiden Antikörperaktivitäten (Tag 14 und Tag 25) in % Tracerbindung angegeben.

Gruppe	n	Tag 0	Tag 14	Tag 15	Tag 17	Tag 25
A	7	100 μ g		500 μ g	100 μ g	Zweite
B	7	Des-Gly	Erste	PVP	Des-Gly	Serum-
C	7	des-Phe	Serum		des-Phe	Gewinnung
D	7	Insulin	Gew.	500 μ g	Insulin	
				PVP-Ins.R		

Tab. 4: Behandlungsschema im Rahmen einer Sekundärantwort

Differenz in %
Bindungskapazität

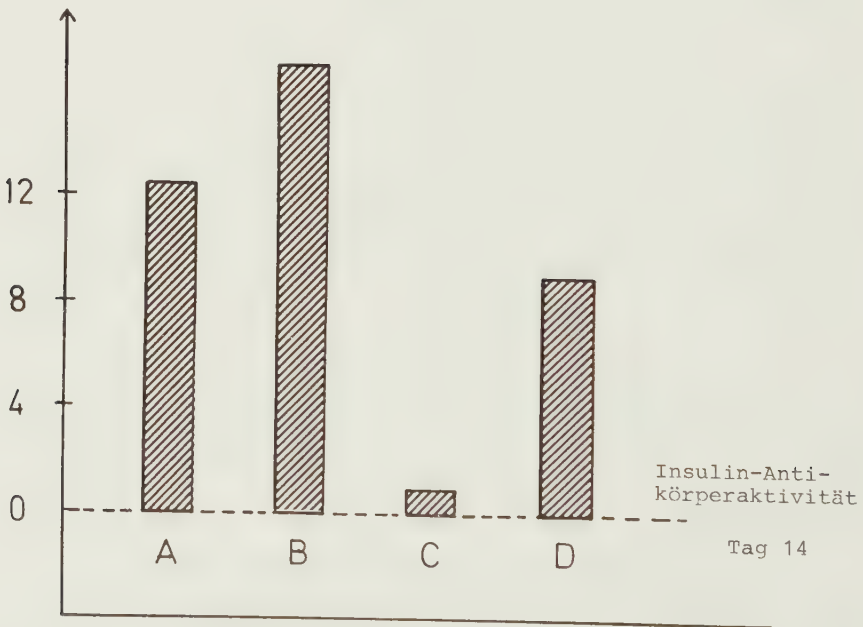


Abb. 5: Wirkung von PVP-Insulin im Rahmen einer Sekundärantwort. Angegeben wird jeweils die Differenz der Insulin-Antikörperaktivität (Tag 14 u. Tag 25) in % Bindungskapazität gegenüber radioaktiv markiertem Insulin.

Die Ergebnisse der Referenzgruppen A und B entsprechen denen einer normalen, unbeeinflussten Sekundärantwort. Da die Tiere vor Reimmunisierung nur unverändertes PVP erhalten hatten, findet sich eine deutliche Steigerung der Insulin-Antikörperaktivität des Mäuseserums im Vergleich zum Ausgangswert am Tag 14.

Werden die Tiere jedoch, wie bei den Gruppen C und D geschehen, vor Reimmunisierung mit Insulin mit PVP-Insulin-Konjugat behandelt, so fällt der Anstieg der Insulin-Antikörperaktivität erkennbar niedriger aus.

Die aufgetretenen Schwankungen zwischen gleich behandelten Gruppen bedürfen einer weiteren Erörterung; diesbezüglich darf auf den Diskussionsteil verwiesen werden.

Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen:

Die sekundäre Immunantwort gegenüber nativem Insulin läßt sich durch PVP-Insulin-Konjugate im Sinne einer Abschwächung des Boostereffektes nach Reimmunisierung mit dem Antigen Insulin erkennbar beeinflussen.

IV. Darstellung der Wirkung von PVP-Insulin anhand des Lymphozytentransformationstests

Für den LTT wurden die Tiere in 7er Gruppen nach dem Schema einer Primärantwort wie folgt vorbehandelt:

- Tag 0: Injizierung von 500 ug PVP (Vergleichsgruppe A)
oder 500 ug PVP-Insulin-Konjugat (Gruppe B)
(Hier wurde PVP-Ins. S mit 13,7 % Ins. S im
Konjugat verwendet)
- Tag 1: Immunisierung aller Tiere mit Des-Gly-, des-Phe-
Insulin in CFA i.p.
- Tag 15: Entnahme der Milzen, Herstellung von Zell-
suspensionen und Durchführung des LTT's.

Anhand des Lymphozytentransformationstests wurde versucht die Mitoserate der zu untersuchenden Milzzellpopulationen durch Nachstimulation mit dem Antigen Insulin zu steigern. Da die einzelnen Milzzellpopulationen bereits im Organismus der Maus mit artfremden Insulin in Kontakt gekommen waren, entspricht der LTT somit im vorliegenden Fall einer Sekundärantwort in vitro.

Den Tieren wurden nach Abschluß der Vorbehandlung (s.o.) unter sterilen Kautelen die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen in RPMI hergestellt. Je 0,2 ml der homogenen Milzellsuspension wurden hierauf auf Mikrotiterplatten pipettiert. Im Anschluß daran erfolgte die Zugabe der einzelnen Insulinlösungen gemäß dem angegebenen Pipettierschema (Abb. 6).

Die Insulinlösungen wurden jeweils mit RPMI verdünnt. Nach Zusatz von 1 % isologem Mausserum wurden die Zellen zunächst für 4 Tage im Brutschrank inkubiert, anschließend mit ³H-Thymidin markiert und nach weiteren 18 h Inkubation zur Beendigung der Mitose bei -20°C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Zellen nach vorherigem Auftauen maschinell geerntet und nach Trocknung und Zugabe

von Szintillationsflüssigkeit im Tri. carb. liquid scintillation spectrometer die eingebaute Radioaktivität gemessen.

Die Fragestellung für diesen Versuch ergab sich wie folgt: Läßt sich durch Vorbehandlung der Tiere mit PVP-Insulin-Konjugat die Mitosesteigerung im LTT durch Nachstimulation mit Insulin abschwächen bzw. unterdrücken, so daß auf einen suppressiven Effekt des PVP-Insulins geschlossen werden kann ?

Tab. 5 zeigt die Ergebnisse.

Die angegebenen Kontrollcounts innerhalb der einzelnen Gruppen entsprechen Zählraten von nicht mit Insulin stimulierten Zellpopulationen.

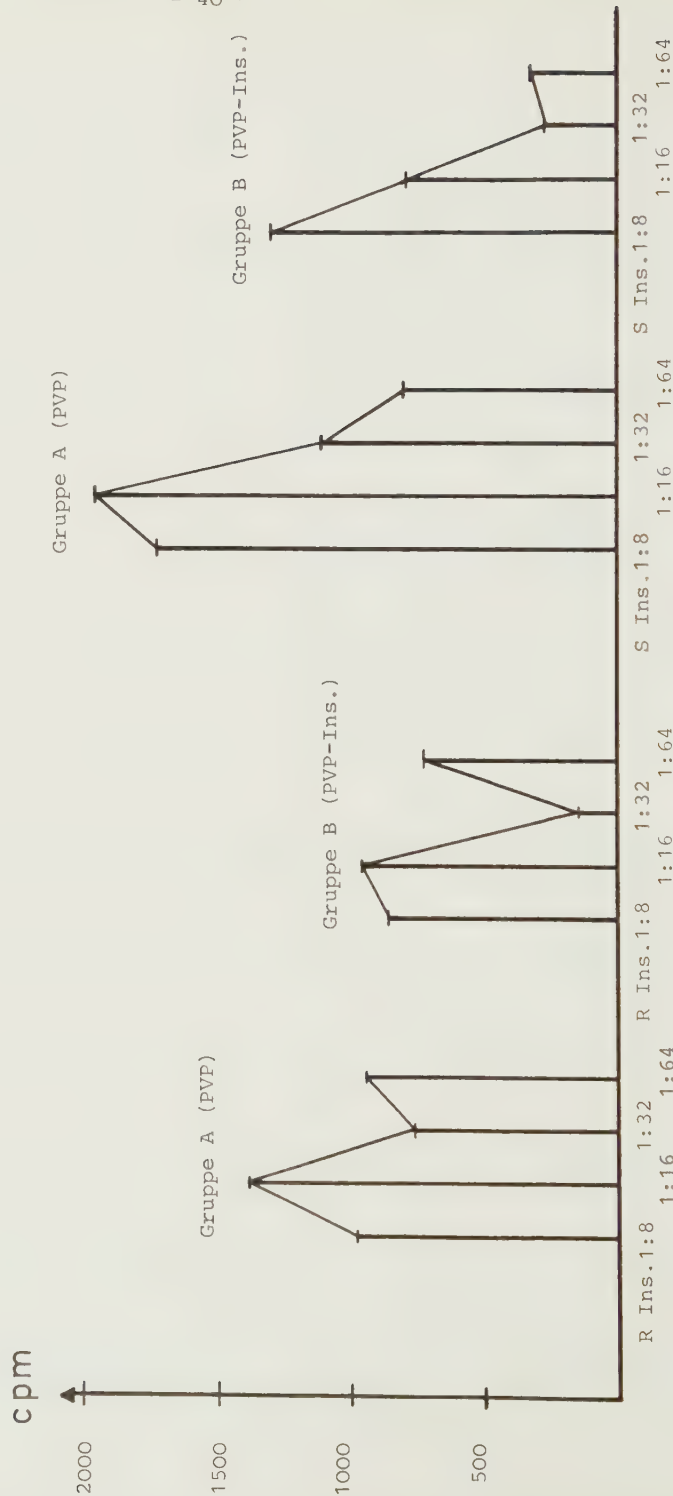
Bei den angegebenen Nettocounts sind die Kontrollcounts bereits abgezogen, so daß hieraus ersichtlich ist, um wieviel die Mitoserate der Zellpopulationen durch Stimulation mit Insulin gesteigert werden konnten. Die Insulinkonzentrationen, mit welchen stimuliert wurde, sind neben den einzelnen Werten angegeben. Ebenso wurde die jeweils dazugehörige Standardabweichung mit aufgeführt.

Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse in Abb. 7 graphisch dargestellt.

Gruppe A (vorbehandelt mit PVP alleine)			Gruppe B (vorbehandelt mit PVP-Ins. S)		
Kontrollcounts: 2332			Kontrollcounts: 2540		
Nettocounts		SD	Nettocounts		SD
R 1:8	987	701	R 1:8	864	342
R 1:16	1396	374	R 1:16	967	351
R 1:32	763	481	R 1:32	153	130
R 1:64	949	419	R 1:64	729	736
S 1:8	1726	343	S 1:8	1301	358
S 1:16	1958	450	S 1:16	797	562
S 1:32	1120	842	S 1:32	278	167
S 1:64	809	233	S 1:64	333	276

Tab. 5: Wirkung von PVP-Insulin, dargestellt anhand des
Lymphozytentransformationstests
Nettocounts = Nettoeinbau von ^3H -Thymidin in cpm
(Impulse /Minute)

Abb. 7: Wirkung von PVP-Insulin, dargestellt anhand des Lymphozytentransformationstests



Wie aus den Ergebnissen zu entnehmen ist, sind die einzelnen Zellpopulationen in Abhängigkeit von den verwendeten Insulinkonzentrationen unterschiedlich stimuliert worden. Die beste Steigerung der Mitoserate wurde jeweils mit Insulinverdünnungen von 1:8 und 1:16 erreicht.

Weiterhin ist eine Kreuzreaktion zwischen Ins. R und Ins. S nachzuweisen. So läßt sich durch beide Insulinarten im Vergleich zur Kontrollgruppe die Mitoserate steigern.

Bei Zellpopulationen der Gruppe B, also von Tieren, welche mit PVP-Ins. S-Konjugat vorbehandelt waren, fällt die Steigerung der Mitoserate in Gegenüberstellung mit der Vergleichsgruppe A, welche nur mit PVP vorbehandelt war, erkennbar niedriger aus.

Als problematisch erweisen sich hierbei jedoch die relativ hohen Standardabweichungen des Testes. Ein weiteres Problem liegt im maximal erreichten Stimulationswert. Vergleicht man die Counts der Kontrolle mit den einzelnen Nettocounts, so zeigt sich, daß die Mitoserate der Zellpopulationen maximal bis 84 % des Ausgangswertes (Kontrollcounts) gesteigert werden konnten.

Aus diesem Grund wurde auf die Angabe von Stimulationsindizes, wie allgemein bei LTT's üblich, verzichtet.

Die anfangs gestellte Frage ist somit folgendermaßen zu beantworten:

Durch den Lymphozytentransformationstest kann zwar ein abschwächender Effekt des PVP-Insulin-Konjugats auf die Immunantwort gegenüber nativem Insulin nachgewiesen werden, die Signifikanz dieses Testes ist jedoch nicht hoch genug.

Die aufgezeigten Effekte können als Hinweis auf derartige Wirkungen verwendet werden. Eine weitere Überprüfung mit Hilfe anderer Testmethoden erscheint notwendig.

V. Nachweis von Anti-Insulin-Ig sezernierenden Zellen
durch den haemolytischen Plaque-Test

1. Überprüfung des Testes hinsichtlich Eignung für
das geplante Experiment und Spezifitätskontrolle

Folgende Fragen waren vorab zu klären:

- a) Lassen sich genügend sezernierende Zellen nachweisen, um eine spätere Suppression durch PVP-Insulin signifikant erkennen zu können ?
- b) Kann eine Spezifität für Insulinantikörper sezernierende Zellen erreicht werden ?

Die Immunisierung von 7 Tieren erfolgte nach dem Schema einer Sekundärantwort.

Tag 0: Immunisierung mit je 100 µg Des-Gly-, des-Phe-Insulin in CFA i.p.

Tag 14: Reimmunisierung (Boosterung) mit je 100 µg Des-Gly-, des-Phe-Insulin

Tag 22: Durchführung des haemolytischen Plaque-Testes

Den Tieren wurden am Versuchstag unter aseptischen Bedingungen die Milzen entnommen und Zellsuspensionen in RPMI hergestellt. Nach dem Einstellen der Milzzellsuspensionen auf unten beschriebene Zellkonzentrationen folgte der eigentliche Plaque-Test.

Hierbei wurde in vorbereitete Petrischalen mit einer Grundschrift bestehend aus 2 %igem Agar purum folgende Mischung zugegeben:

0,6 %ige Agarose angereichert mit DEAE Dextran, Milzzellsuspension in entsprechender Konzentration sowie insulinkonjugierte Hammelerythrozyten. Die gleichmäßige Verteilung der Deckschicht erfolgte durch vorsichtiges Ausrotieren. Im Anschluß daran wurde

bei einem Teil der Petrischalen noch Anti-Maus-Ig-Serum in entsprechender Verdünnung hinzugegeben. Die Schalen wurden nun zunächst für 1,5 h im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von Komplement erfolgte eine weitere Inkubation von 1 h, nach deren Ablauf die gebildeten Haemolyse-Plaques bestimmt werden konnten.

Nähere Angaben hierzu sind dem Material- und Methodenteil zu entnehmen.

Die Gruppeneinteilung für den Plaque-Test ergab sich wie folgt:

- Gruppe A: Anwendung einer Milzzellsuspension von immunisierten Tieren in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml, was bei einem jeweiligen Einsatz von 0,1 ml ca. 10^5 Zellen pro Petrischale entspricht.
- Gruppe B: Erhöhung der Zellkonzentrationen auf 10^7 Zellen/ml, so daß pro Petrischale ca. 10^6 Zellen entfallen.
- Gruppe C: Zusatz von 100 µg/ml freiem Insulin bei einer Zellkonzentration von 10^7 Zellen/ml. Hierdurch sollte die Spezifität des Testes nachgewiesen werden.
- Gruppe K (= Kontrolle): Einsatz von Milzzellen aus nicht behandelten Tieren in einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml.
- Gruppe E (= Erythrozyten): Kein Einsatz von Milzzellen. Es wurden nur markierte Erythrozyten und Agarose auf die Petrischalen pipettiert.

Die insulinkonjugierten Hammelerythrozyten wurden bei diesem Test in 10 %iger Konzentration verwendet. Zum Nachweis der "direkten Plaques" erfolgte bei einem Teil der Petrischalen keine Zugabe von Anti-Maus-Ig-Serum.

Die Ergebnisse sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Gruppe	Zellkonz.	Schalen Nr.	Anti-Maus-Ig ja nein		PFC/Schale
A	10^6 /ml	1,2		X	1,2
	= 10^5 /Schale	3,4	X		9,11
B	10^7 /ml	5,6,7,8		X	1,1,2,0
	= 10^6 /Schale	9,10,11,12	X		67,80,62,68
C	10^7 /ml	13,14		X	0,0
	+ Insulin	15,16	X		1,0
K	10^7 /ml	17,18		X	0,0
		19,20	X		0,0
E	nur Erys	21	X		0

Tab. 6: Haemolytischer Plaque-Test im Rahmen einer
Anti-Insulin-Immunantwort
PFC = Plaque-forming cells (entspricht
Haemolyse-Plaques)

Die anfangs gestellte Frage a) läßt sich durch die Ergebnisse der Gruppen A und B eindeutig beantworten.

Bei einer eingesetzten Zellkonzentration von 10^7 Milzzellen/ml Zellsuspension sind genügend antikörpersezernierende Zellen nachzuweisen. Eine Suppression durch PVP-Insulin-Konjugate wäre bei dieser Plaque-Zahl erkennbar. Erniedrigt man die Zellkonzentration um eine 10er Potenz auf 10^6 Milzzellen/ml, so sinkt die Zahl der antikörpersezernierenden Zellen (= Plaque-Zahl) entsprechend. (Siehe Gruppe A)

Die Frage nach der Spezifität des Testes für Insulinantikörper sezernierende Zellen (Frage b) kann durch die Ergebnisse der Gruppe C geklärt werden. Wird zu den Zellsuspensionen freies Insulin im Überschuß zugesetzt, so sinkt die Zahl der nachweisbaren plaquebildenden Zellen gegen Null. Die sezernierten Antikörper werden hierbei durch das zugesetzte Insulin abgefangen, so daß eine Bindung an das Insulin auf die Erythrozytenoberfläche nicht mehr möglich ist.

Der Test kann also als spezifisch für Insulinantikörper sezernierende Zellen angesehen werden.

Werden Milzzellen von nicht behandelten Tieren eingesetzt (siehe Gruppe K), so lassen sich keine sezernierenden Zellen nachweisen (Plaquebildung).

Desweiteren sind bei alleiniger Verwendung von markierten Erythrozyten ebenfalls keine Plaques nachweisbar.

Die eingesetzten Kontrollen verliefen somit erwartungsgemäß.

"Direkte" Plaques (keine Zugabe von Anti-Maus-Ig) als

Hinweis auf IgM-Antikörper konnten allenfalls vereinzelt nachgewiesen werden, wobei sich die Frage stellt, ob es sich hier nicht um solitäre Artefakte handelt. Da die Tiere nach dem Schema einer Sekundärantwort vorbehandelt wurden, waren IgM-Antikörper kaum zu erwarten.

2. Haemolytischer Plaque-Test zur Überprüfung der Wirkung von PVP-Insulin im Rahmen einer Sekundärantwort

Nachdem der haemolytische Plaque-Test (n. Jerne) hinsichtlich Eignung und Spezifität überprüft worden war (siehe V.1), sollte nun mit diesem Test die Wirkung von PVP-Insulin auf eine Sekundärantwort nachgewiesen werden. Die Mäuse wurden in Gruppen von je 14 Tieren wie folgt behandelt:

Tag 1: Immunisierung mit Des-Gly-, des-Phe-Insulin
in CFA i.p.

Tag 16: Injizierung von PVP (Kontrolle) oder
PVP-Insulin-Konjugat

Tag 18: Reimmunisierung mit Des-Gly-, des-Phe-Insulin

Tag 25: Entnahme der Milzen, Herstellung von Milzzell-
suspensionen und Durchführung des
haemolytischen Plaque-Testes.

In Abweichung zum Vorversuch wurden bei diesem Plaque-Test die Erythrozyten in einer 30 %igen Konzentration verwendet, um die Haemolyse-Plaques um die einzelnen sezernierenden Zellen herum deutlicher sichtbar zu machen. Die Zellkonzentration wurde auf 2×10^7 /ml erhöht (= 2×10^6 Zellen/Schale), um die Plaque-Zahl pro Petrischale anzuheben. Zellen von Tieren gleicher Gruppe wurden gepoolt. Gruppe A wurde vor Reimmunisierung nur mit PVP behandelt. Gruppe B erhielt PVP-Ins. R (3 % Ins. R) vor Reimmunisierung. Gruppe C erhielt PVP Ins. S (4,2 % Ins. S) vor Reimmunisierung.

Abb. 8 veranschaulicht die Ergebnisse graphisch.

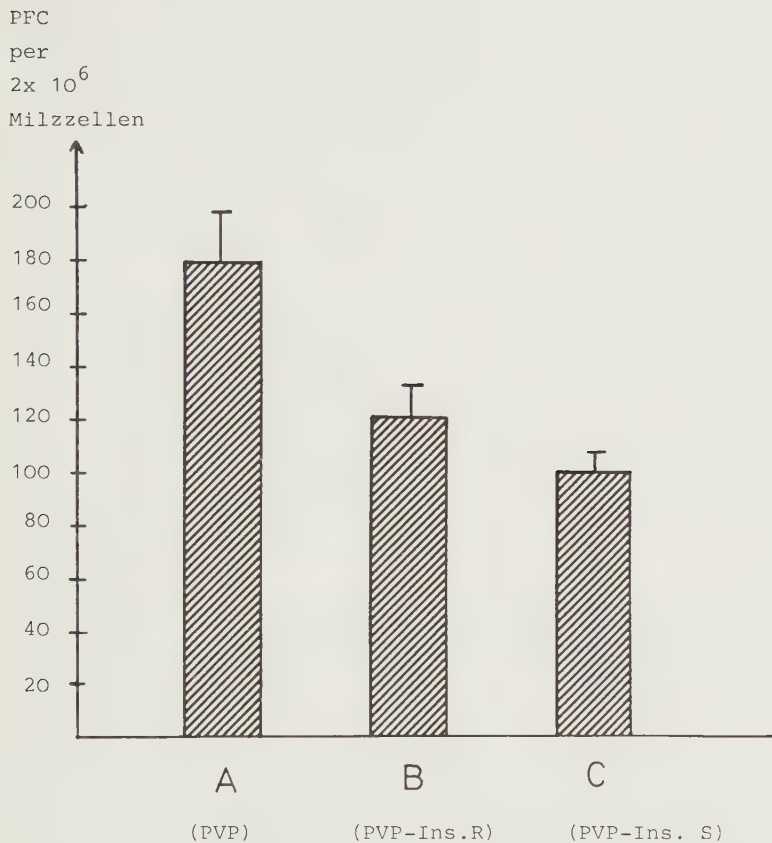


Abb. 8: Wirkung von PVP-Insulin auf die sekundäre Immunantwort gegenüber nativem Insulin, dargestellt anhand des hämolytischen Plaque-Tests

Da die IgM sezernierenden Zellen auch hier vernachlässigt werden konnten (vgl. Vorversuch) und es sich im wesentlichen um IgG sezernierende Zellen handelte, welche nur durch Zugabe von Anti-Maus-Ig-Serum darzustellen waren, wurde auf die getrennte Angabe von "direkten" und "indirekten" Plaques verzichtet.

Gruppe A als Referenzgruppe weist die höchste Zahl an PFC auf.

Im Vergleich dazu ist bei den mit PVP-Insulin behandelten Gruppen (B und C) die Anzahl der PFC deutlich erniedrigt.

Durch den haemolytischen Plaque-Test kann also ebenfalls eine deutliche Abschwächung der Immunantwort gegenüber nativem Insulin durch PVP-Insulin-Konjugate nachgewiesen werden.

3. Nachweis der IgG-Subklassenspezifität der Anti-Insulin-Immunantwort unter PVP-Insulin

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Immunantwort gegenüber den verschiedenen antigenen Determinanten des Insulins durch verschiedene IgG-Subklassen reguliert wird, welche möglicherweise verschieden auf die Applikation von PVP-Insulin-Konjugaten reagieren.

Hierzu wurden beim Plaque-Test subklassenspezifische Antiseren hinzugegeben (vgl. Material und Methoden), so daß auf diese Weise subklassenspezifische Plaques nachgewiesen werden konnten.

Behandlungsschema und Versuchsaufbau entsprechen dem unter V.2. beschriebenen Versuch.

Gruppe A erhielt vor Reimmunisierung nur PVP. Gruppe C erhielt vor Reimmunisierung PVP-Insulin S (4,2 % Ins. S).

IgG-Subklasse	PFC per 2×10^6 Zellen	
	Gruppe A (PVP)	Gruppe C (PVP-Ins. S)
1	123 ± 9	63 ± 5
2a	7 ± 1	3 ± 2
2b	11 ± 5	4 ± 2
3	7 ± 1	6 ± 3

Tab. 7: IgG-Subklassenspezifität der Anti-Insulin-Immunantwort unter PVP-Insulin

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, werden von den Milzzellen im wesentlichen Antikörper der IgG-1-Subklasse sezerniert.

Die Zellsuppression durch PVP-Insulin betrifft folglich ebenfalls nur diese Subklasse. Durch eine einmalige Injektion von PVP-Insulin konnte auch hier die Anzahl der sezernierenden Zellen auf fast 50 % reduziert werden.

4. Zusammenfassung

Unter V.1. konnte die Eignung des haemolytischen Plaque-Testes für das geplante Experiment hinreichend nachgewiesen werden. Zum einen wurde eine ausreichende Plaque-Zahl erreicht, um eine mögliche Wirkung von PVP-Insulin-Konjugaten auf eine Sekundärantwort erkennen zu können.

Zum anderen kann die Frage nach der Spezifität des Testes für Insulinantikörper sezernierende Zellen ohne Einschränkung bejaht werden.

Unter V.2. sind die Wirkungen von PVP-Insulin-Konjugaten im Rahmen einer Sekundärantwort aufgezeigt.

Durch eine einmalige Injektion von PVP-Insulin vor Reimmunisierung mit nativem Insulin kann die Anzahl der Insulinantikörper sezernierenden Zellen (= plaquebildenden Zellen PFC) erheblich gesenkt werden.

Durch PVP-Insulin R wurde eine Senkung von ca. 32 % des Kontrollwertes (PVP-Gruppe) erzielt.

Durch PVP-Insulin S konnte eine Senkung von ca. 44 % des Kontrollwertes erreicht werden.

Mit Hilfe des haemolytischen Plaque-Testes nach Jerne kann folglich ebenfalls gezeigt werden, daß PVP-Insulin-Konjugate die Sekundärantwort gegenüber nativem Insulin deutlich abschwächen.

In Abschnitt V.3. wird die IgG-Subklassenspezifität der Anti-Insulin-Immunantwort unter PVP-Insulin-Konjugaten nachgewiesen. Wie die Ergebnisse der Gruppe A zeigen, werden bei einer Sekundärantwort gegenüber Insulin im wesentlichen Antikörper der IgG-1-Subklasse gebildet. Die Abschwächung der Immunantwort durch PVP-Insulin, welche bei diesem Experiment bei nahezu 50 % des Kontrollwertes liegt (Gruppe C), findet folglich nur im Rahmen dieser Subklasse statt.

Zur weiteren Diskussion der Ergebnisse darf wieder auf die Diskussion verwiesen werden.

VI. Zelltransferexperiment

Im Verlauf der bereits beschriebenen Versuchsreihen stellten sich folgende Fragen:

- a) Beruht die Reduzierung der Immunantwort gegenüber Insulin durch PVP-Insulin-Konjugate möglicherweise auf einem "Wegfangen" der gebildeten Antikörper durch das im PVP-Insulin-Konjugat gebundene Insulin ?

Für den Fall, daß obige Frage mit "nein" beantwortet werden kann

- b) Wird die Reduzierung der Immunantwort gegenüber Insulin durch PVP-Insulin-Konjugate auf zelluläre Basis reguliert ?

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde ein Zelltransferexperiment durchgeführt.

Vergleiche hierzu Abb. 9.

Zwei Spendergruppen wurden wie folgt behandelt:

Bei beiden Gruppen erfolgte zunächst eine Immunisierung mit je 100 µg Des-Gly-, des-Phe-Insulin in CFA. Vier Tage später erhielt eine Gruppe nur PVP (Kontrolle), die andere Gruppe PVP-Ins. S (4,2 % Ins. S).

Nach Ablauf von insgesamt 14 Tagen wurden den Tieren die Milzen entnommen und Zellsuspensionen in Hanks Medium vorbereitet.

Die Zellen wurden in mit 600 rad bestrahlte Empfänger-tiere injiziert. Die Bestrahlung erfolgte, um das zelluläre Immunsystem der Empfängertiere durch Knochenmarkssuppression weitgehend auszuschalten.

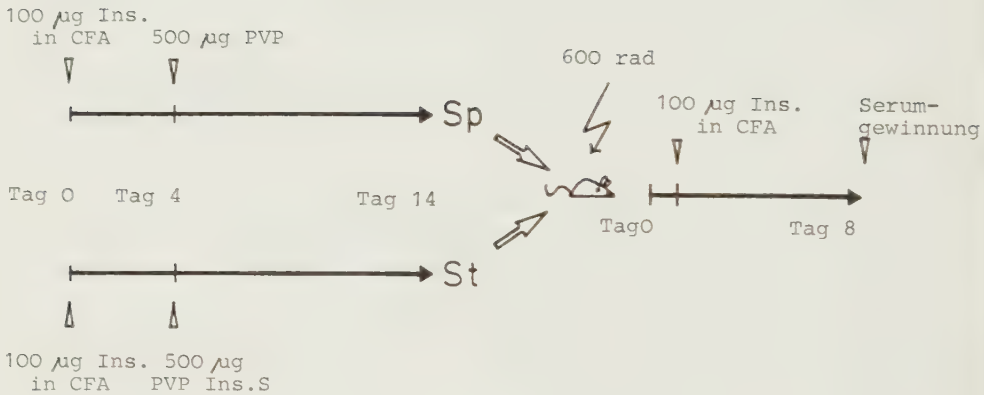


Abb. 9: Behandlungsschema im Rahmen des Zelltransferexperiments
Sp = primed spleen cells (normale Immunisierung, kein PVP)
St = tolerized spleen cells (Toleranzinduktion durch PVP-Insulin)

Einen Tag nach Zellübertragung werden die bestrahlten Empfänger-tiere mit Insulin in CFA immunisiert, was im wesentlichen einer Boosterung und somit einer Sekundärantwort entspricht, da die übertragenen Milzzellen bereits im Spendertier mit artfremdem Insulin in Kontakt gekommen waren.

Nach Ablauf von insgesamt 8 Tagen erfolgte die Serumgewinnung zur späteren Bestimmung der Insulin-Antikörperaktivität.

Tab. 8 zeigt die Ergebnisse.

Gruppe	Übertragene Zellen	Anti-Insulin-Antikörperaktivität des Serums in % Bindungskapazität	
A	10^7 Sp	42	(40/44)
B	10^7 St	17	(15/19)
C	10^7 Sp + 10^7 St	27,5	(29/26)
D	keine	14	(13/15)

Tab. 8: Anti-Insulin-Antikörperaktivität (angegeben in % Bindungskapazität gegenüber radioaktiv markiertem Insulin) nach Zelltransfer in bestrahlte Empfänger und Immunisierung mit Insulin.

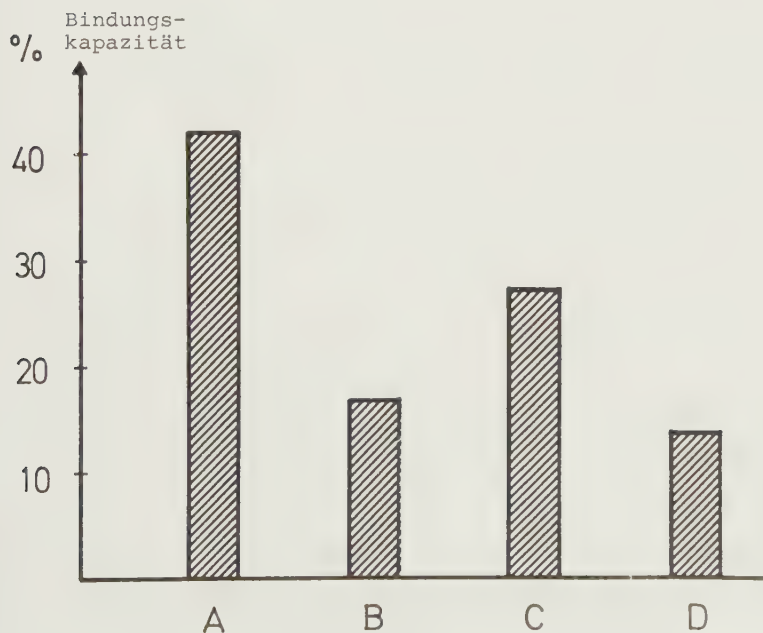


Abb. 10: Graphische Darstellung der in Tab. 8 gezeigten Ergebnisse

Gruppe A erhielt Zellen der ersten Spendergruppe, welche nicht mit PVP-Insulin, sondern nur mit PVP behandelt wurden (vgl. Abb. 9). Gruppe B erhielt Zellen der zweiten Spendergruppe, welche mit PVP-Insulin S behandelt wurden. Gruppe C erhielt ein Gemisch aus obigen Zellgruppen. Gruppe D erhielt keine Zellen.

Wie aus den Ergebnissen zu entnehmen ist, zeigt die Vergleichsgruppe A erwartungsgemäß die höchste Anti-Insulin-Antikörperaktivität. Werden jedoch Zellen von mit PVP-Insulin behandelten Spendertieren übertragen (Gruppe B), so sinkt die Anti-Insulin-Antikörperaktivität fast auf das Niveau der Kontrolltiere (Gruppe D) ab. Eine aktive Unterdrückung der Immunantwort zeigt sich, wenn man Milzzellen beider Spendergruppen gemischt überträgt (Gruppe C). Zellen der mit PVP-Insulin behandelten Spendertiere bewirken in diesem Fall eine aktive Suppression der Zellen, welche aus nicht mit PVP-Insulin behandelten Spendertieren stammen.

Werden den Empfängertieren keine Milzzellen übertragen, so liegt die Anti-Insulin-Antikörperaktivität des Serums auf einem niedrigen Niveau (Gruppe D; Kontrolle).

Die am Anfang des Kapitels gestellten Fragen lassen sich nun wie folgt beantworten.

Obwohl die bestrahlten Empfängertiere selbst kein PVP-Insulin-Konjugat erhielten, fand sich bei den Gruppen B und C eine deutliche Reduktion der Immunantwort gegenüber nativem Insulin.

Die Reduktion der Anti-Insulin-Immunantwort durch PVP-Insulin-Konjugate beruht somit nicht auf einem "Wegfangen" der gebildeten Antikörper durch das im PVP-Insulin-Konjugat gebundene Insulin.

Wie die Ergebnisse ebenfalls beweisen, ist die durch PVP-Insulin induzierte Reduzierung der Anti-Insulin-Immunantwort durch Zelltransfer übertragbar, sofern das zelluläre Immunsystem der Empfänger durch Bestrahlung weitgehend ausgeschaltet wird.

Werden mit PVP-Insulin supprimierte Zellen mit nicht supprimierten Zellen gemischt übertragen, so zeigt sich eine aktive Unterdrückung der im Spendertier nicht mit PVP-Insulin supprimierten Zellen. Die Reduzierung der Anti-Insulin-Immunantwort durch PVP-Insulin-Konjugate muß somit auf zellulärer Basis reguliert werden.

VII. Versuch einer Simulation der klinischen Situation eines insulinresistenten Diabetikers

Die klinische Situation für sehr viele Diabetiker stellt sich in einer Abhängigkeit von täglichen Insulininjektionen dar.

Im nächsten Experiment wurde nun versucht, diese Situation am Tiermodell zu simulieren.

Hierbei stellte sich folgende Frage:

Löst sich durch Zusatz von PVP-Insulin zu nativem Insulin die Immunantwort auch bei häufigen Insulininjektionen unterdrücken ?

Die eingesetzten Tiere sollten annähernd mit Diabetikern vergleichbar sein, welche bereits artfremdes Insulin erhalten hatten und dadurch bereits höhere Antikörpertiter gegen Insulin aufweisen.

Zu diesem Zweck wurden allen in den Versuch aufgenommenen Tieren nach dem Schema einer Sekundärantwort mit Insulin vorimmunisiert:

Tag 0: Immunisierung mit je 100 μ g Des-Gly-, des-Phe-Insulin in CFA i.p.

Tag 14: Boosterung mit je 100 μ g Insulin in CFA i.p.

Tag 21: Entnahme von Serum zur Bestimmung des Ausgangstiters (Anti-Insulin-Antikörperaktivität)

Anschließend wurden 2 Gruppen von je 10 Tieren gebildet und in den eigentlichen Versuch aufgenommen.

Die Tiere erhielten nun jeden 2. oder 3. Tag entweder (Gruppe A) ein Gemisch aus 50 μ g PVP und 50 μ g freiem

Insulin (Des-Gly-,des-Phe-Insulin), oder ein Gemisch aus 50 μ g PVP-Insulin S (4,2 % Ins.) und 50 μ g freiem Insulin i.p. (Gruppe B).

Hierdurch sollten die "häufigen" Insulininjektionen eines Diabetikers nachgeahmt werden.

Als Zusatz bei jeder Injektion wurde, wie oben erwähnt, entweder PVP alleine (Vergleichsgruppe) oder PVP-Insulin S beigemischt.

Nach 14 und nach 20 Tagen wurde den Tieren Serum entnommen und jeweils die Anti-Insulin-Antikörperaktivität gemessen.

Abb. Nr. 11 verdeutlicht die Ergebnisse.

Die einzelnen Injektionen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Angegeben wird jeweils die Anti-Insulin-Antikörperaktivität des Mäuseserums in % der Ausgangsaktivität, welche gleich 100 % gesetzt wurde.

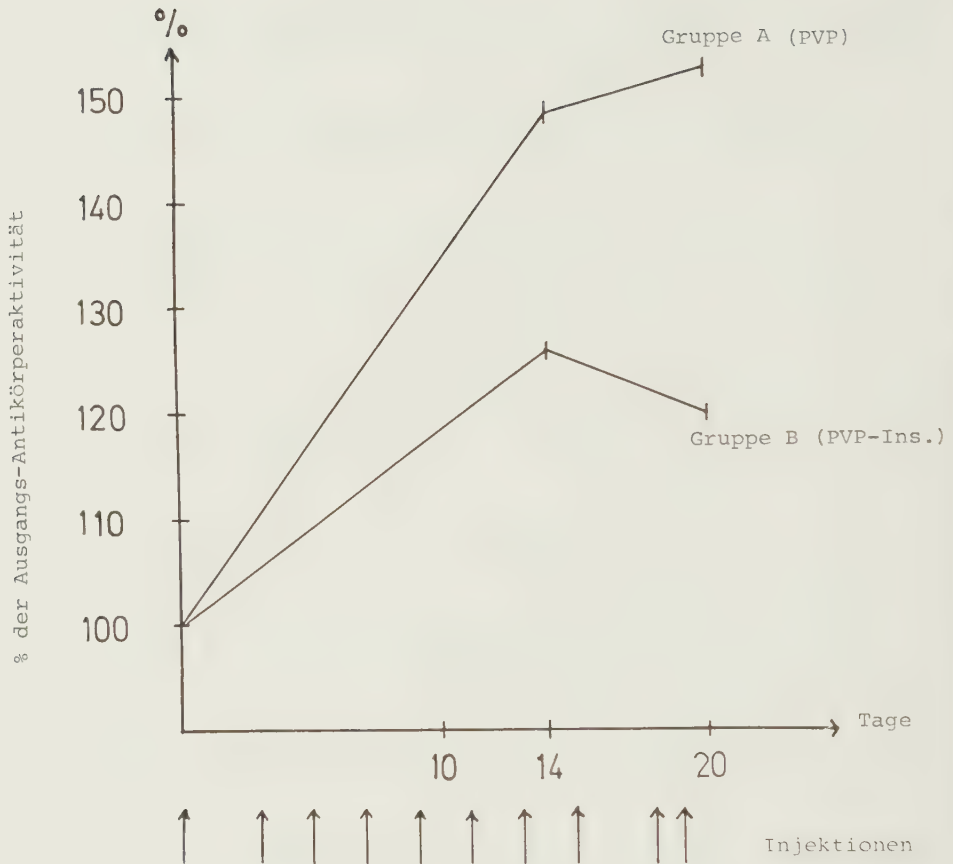


Abb. 11: Wirkung von PVP-Insulin im Rahmen einer gesteigerten Immunantwort durch häufige Insulininjektionen

Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, steigt die Anti-Insulin-Antikörperaktivität der Vergleichsgruppe A (nicht mit PVP-Insulin im Gemisch) nach den 2 bis 3-tägigen Insulin-Injektionen weiter stark an.

Wird dem freien Insulin jedoch PVP-Insulin S zugemischt, wie es bei Gruppe B erfolgt ist, so verläuft der Anstieg der Antikörperaktivität wesentlich schwächer, bis nach ca. 2 Wochen diese wieder zu sinken beginnt.

Das Niveau der Ausgangs-Antikörperaktivität konnte im Rahmen dieses Versuches jedoch nicht erreicht werden.

Trotzdem ist ein hemmender Effekt des PVP-Insulin-Konjugates auf die Antikörperaktivitätsentwicklung deutlich nachweisbar. Die anfangs gestellte Frage läßt sich also wie folgt beantworten:

Durch Zusatz von PVP-Insulin zu nativem Insulin kann die Immunantwort gegenüber Insulin auch bei häufigeren Insulininjektionen negativ beeinflußt werden.

Der Stellenwert dieses Versuches im Rahmen der Gesamtuntersuchung darf jedoch nicht überbewertet werden.

So handelt es sich hier nicht um den Beweis einer ausreichenden klinischen Wirksamkeit von PVP-Insulin-Konjugaten, welcher selbstverständlich mit umfangreicheren und signifikanteren Methoden durchgeführt werden müßte.

Zur weiteren Besprechung der Ergebnisse muß auf die Diskussion verwiesen werden.

E. Diskussion

I. Besprechung der Ergebnisse im Einzelnen

1. Vorbemerkungen

Vor der Besprechung der Ergebnisse im Einzelnen vorab noch einige Hinweise zum gewählten Tiermodell sowie zu den angewandten Testmethoden.

Wie von zahlreichen Autoren beschrieben (20, 22, 33, 42, 43, 48) reagieren nicht alle Mäusestämme auf die Applikation von Insulin einer anderen Spezies im Sinne einer Immunantwort. Bei dem für die vorliegenden Untersuchungen gewählten Mäusestamm BALB/C war dieses Kriterium jedoch erfüllt. So konnte z. B. Keck (22) bei Balb/C Mäusen eine IgG-Immunantwort gegenüber artfremdem Insulin vom Schwein, Rind, Schaf und Pferd eindeutig nachweisen.

Die Testmethoden anhand derer die Wirkung von PVP-Insulin auf die Immunantwort gegenüber nativem Insulin untersucht wurde, sind alle vom Prinzip her gängige Verfahren zur Erforschung der Immunogenität des Insulins. Antikörperbestimmungen mit Hilfe von radioaktiv-markiertem Insulin finden sich zum Beispiel bei Keck (22) und Arquilla et al. (1), Lymphozytenproliferationsteste bei Rosenthal et al. (38), Talmon et al. (47) und Kontiainen und Scheinin (28), Plaque-Teste bei Schroer et al. (42) und Thomas et al. (49) sowie Zelltransferexperimente bei Momayezi und Keck (33) und Kapp und Bucy (20).

2. Die Bestimmung der Serumantikörperaktivitäten gegenüber Insulin

Wie aus D.II. des Ergebnisteils zu entnehmen ist, reduzieren im Rahmen einer Primärantwort nicht alle der hergestellten PVP-Insulin-Konjugate vom Schwein

oder vom Rind die Immunantwort gegenüber nativem Insulin (gemessen in % Bindungskapazität gegen ^{125}J -Insulin) in gleicher Weise. PVP-Insulin vom Schwein mit 13,7 % Ins. S im Konjugat reduziert die Antikörperaktivität um 29 % des Vergleichswertes, PVP-Insulin S mit 4,2 % Ins. S um 32 %. Bei den PVP-Insulinen vom Rind reduziert PVP-Insulin R mit 9,7 % Ins. R die Immunantwort um 54 % des Vergleichswertes, PVP-Insulin R mit 5 % Ins. R um 41 %.

Die vom Insulingehalt her gesehen dazwischenliegenden Konjugate (PVP-Insulin S mit 8,3 % und 6,5 % Ins.S, sowie PVP-Insulin R mit 7,7 % Ins. R) als auch das Konjugat mit dem geringsten Insulinanteil (PVP-Insulin R mit 3 % Ins. R) weisen eine geringere Wirksamkeit auf.

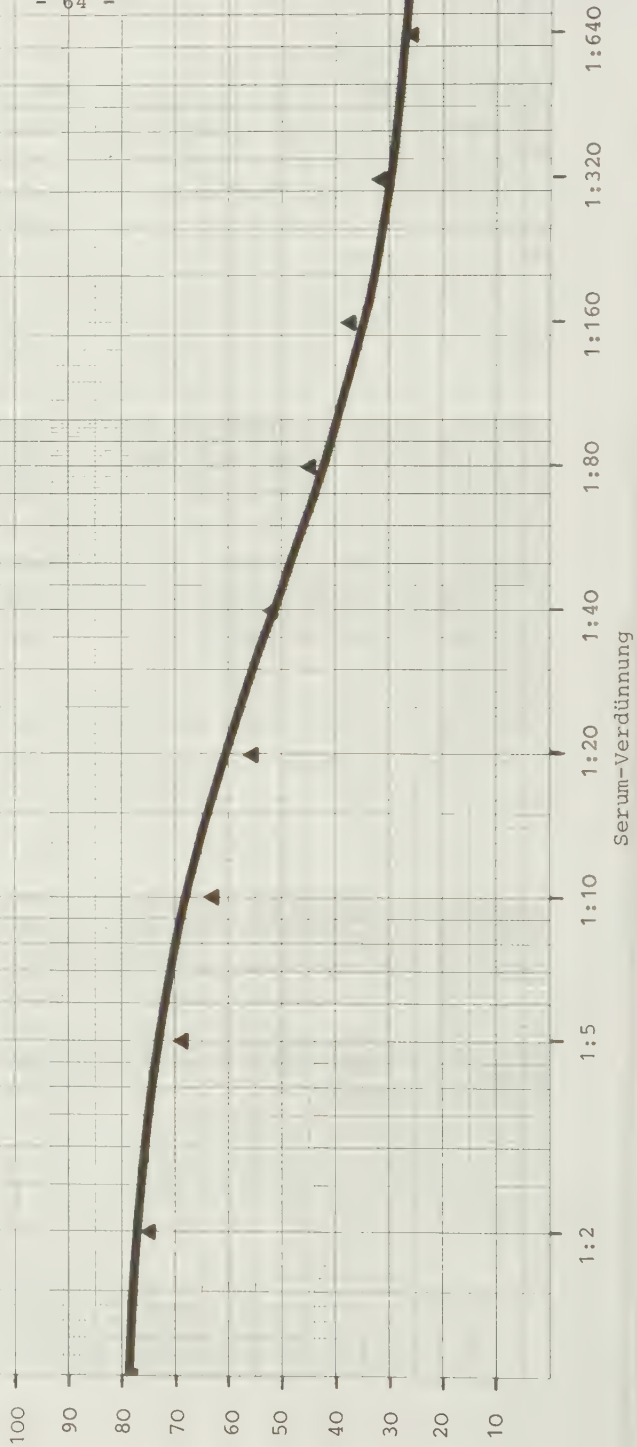
Sterische Unterschiede im Molekülaufbau in Hinsicht auf die Antigen-Präsentation können hierbei als Erklärung herangezogen werden.

In Abb. 12 sind die einzelnen Verdünnungen eines Poolserums mit hohem Insulinantikörpergehalt in Relation zu den jeweils anhand des Farr-Typ-Hapten-Bindungstestes gemessenen Anti-Insulin-Antikörperaktivitäten des Serums (in % Bindungskapazität gegenüber radioaktiv markiertem Insulin) aufgetragen.

Wie aus der dargestellten Kurve zu entnehmen ist, entspricht hier die Reduktion der Antikörperaktivität von ca. 50 % auf ca. 25 % Bindungskapazität, wie sie z. B. bei PVP-Insulin R (mit 9,7 % Ins. R) gefunden wurde, einem Tittersprung von ca. 1:40 auf ca. 1:640. Hierdurch wird deutlich, daß die Insulinantikörperproduktion durch PVP-Insulin tatsächlich in wesentlich größerem Umfang reduziert wird, als dies anhand der gemessenen Bindungskapazitäten deutlich gemacht werden konnte.

% Bindungskapazität

Abb. 12: Insulin-Antikörperaktivität
(in % Bindungskapazität gegenüber
125J-Insulin) in Relation zu
Verdünnungen eines Poolserums



Da nicht für jedes einzelne Experiment eine derartige Relationskurve erstellt wurde und darüberhinaus in Abhängigkeit vom absoluten Insulinantikörpergehalt (Bereich) der Seren Unterschiede im Kurvenverlauf zu finden sind, konnte dieser Punkt nicht in den Ergebnisteil mit aufgenommen, sondern nur an dieser Stelle angesprochen werden.

Vergleicht man die Wirkung von PVP-Insulin mit der Wirkung von PVP-Hapten-Konjugaten, wie sie durch v. Specht et al. z. B. anhand von NIP-PVP (45) dargestellt wurde, so muß man feststellen, daß PVP-Hapten-Konjugate die Immunantwort gegenüber dem entsprechenden Hapten wesentlich stärker supprimieren, als dies bei PVP-Insulin nachgewiesen werden konnte. An PVP gebundenes NIP (NIP-PVP) z. B. ist in der Lage, im Rahmen einer Primärantwort die Immunantwort gegenüber NIP um den Faktor 50 zu reduzieren. Ein Grund hierfür wäre in der größeren Zahl der Epitope bei Insulin zu suchen.

Um die Besprechung der Ergebnisse einer Primärantwort unter PVP-Insulin abzuschließen, läßt sich sagen, daß eine Suppression der Anti-Insulin-Immunantwort durch PVP-Insulin-Konjugate hier eindeutig nachgewiesen werden konnte, wobei der Begriff "Suppression" hierbei nicht im Sinne einer vollständigen Toleranzinduktion, sondern vielmehr im Sinne einer Reduzierung der Antikörperproduktion verstanden werden muß.

Im Gegensatz zur Primärantwort sind die Ergebnisse der Sekundärantwort (D.III.) unter PVP-Insulin weniger deutlich. Dargestellt wurde jeweils die Differenz der Insulinantikörperaktivität zwischen Tag 14 und Tag 25 in % Bindungskapazität gegenüber ¹²⁵J-Insulin.

Die Referenzgruppen A und B weisen eine Steigerung der Antikörperaktivität von 12,5 % bzw. 17,0 % Bindungskapazität auf. Die mit PVP-Insulin behandelten Gruppen C und D zeigen eine Steigerung von 1,0 % bzw. 9,0 %

Bindungskapazität.

Die Schwankungen zwischen gleichbehandelten Gruppen zeigen die verhältnismäßig große Streubreite dieses Versuchs auf.

Eine Ursache hierfür ist wohl der überschießende Boostereffekt in Verbindung mit der relativ großen Halbwertszeit der Immunglobuline, die von Plautz und Little (35) für Insulinantikörper mit 18 Tagen angegeben wird.

Insgesamt betrachtet, kann an dieser Stelle lediglich von einer Abschwächung des Boostereffektes durch PVP-Insulin-Konjugate gesprochen werden, eine Reduktion der Immunantwort durch PVP-Insulin war anhand der Messung von Antikörperaktivitäten des Mäuseserums hier nicht signifikant nachweisbar.

Aus oben genannten Gründen wurden derartige Experimente nicht mehr weiter fortgeführt. Die Wirkung von PVP-Insulin im Rahmen einer Sekundärantwort sollte zudem noch anhand des haemolytischen Plaque-Tests überprüft werden.

Eine ähnlich geartete Problematik zeigen die unter D.VII. aufgeführten Ergebnisse auf. Hierbei wurde versucht, die klinische Situation eines insulinresistenten Diabetikers anhand des Tiermodells nachzuvollziehen. Durch Beimengung von PVP-Insulin zu nativem Insulin sollte die Immunantwort gegenüber diesem Antigen auch bei häufigen Injektionen reduziert werden. Um hohe Ausgangsantikörperaktivitäten zu erhalten, waren die Tiere nach dem Schema einer Sekundärantwort vorimmunisiert worden.

Bei beiden Gruppen kann zunächst anhand des Kurvenverlaufs ein weiterer Anstieg der Antikörperaktivitäten nachvollzogen werden, wenn auch bei der mit PVP-Insulin behandelten Gruppe eine geringere Kurvensteigung auf-

gezeigt wurde.

Erst nach ca. 2 Wochen beginnt die Antikörperaktivität dieser Gruppe wieder zu sinken, während sie bei der Vergleichsgruppe weiter steigt, woraus auch bei häufigen Insulininjektionen auf einen negativen Einfluß von PVP-Insulin auf die Immunantwort gegenüber Insulin geschlossen werden kann.

Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, darf der Stellenwert dieses Versuchs im Rahmen der Gesamtuntersuchung jedoch nicht überbewertet werden.

Es handelt sich hier weder um den signifikanten Nachweis einer Reduktion der Immunantwort, noch um den Beweis einer ausreichenden klinischen Wirksamkeit von PVP-Insulin-Konjugaten.

Da auch hier der überschießende Boostereffekt sowie die rel. große Halbwertszeit der nachgewiesenen Immunglobuline zu einer Verschleierung der PVP-Insulin-Effekte führen, sind für den oben genannten Wirksamkeitsnachweis weiterführende kinetische Untersuchungen mit größeren Versuchszeiträumen und Fallzahlen notwendig. Erst dann wird sich zeigen, ob sich PVP-Insulin im Rahmen einer klinischen Anwendung als spezifische Suppressorsubstanz gegen Anti-Insulin-Antikörper bewähren kann. Der dargestellte Versuch kann somit lediglich als Richtungsweiser für weitere zukünftige Experimente dienen.

3. Der Lymphozytentransformationstest (LTT)

Beim LTT waren die Tiere nach dem Schema einer Primärantwort vorbehandelt worden. Am Versuchstag wurden den Mäusen die Milzen entnommen und Zellsuspensionen hergestellt. Es wurde versucht durch Nachstimulation mit dem Antigen Insulin in vitro die Mitoserate der

Milzzellpopulationen zu steigern. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Vorbehandlung der Tiere mit PVP-Insulin eine Abschwächung der Mitosesteigerung beim LTT zur Folge hat. Wie aus den Ergebnissen zu entnehmen ist (D.IV.), konnte die Mitoserate maximal nur bis ca. auf das Doppelte der Kontrollcounts gesteigert werden (Kontrollcounts 2332 cpm; maximale Steigerung 1958 cpm).

Die besten Steigerungsraten waren mit Insulinverdünnungen von 1:8 und 1:16 zu erreichen. Deutlich erkennbar war die Kreuzreaktion zwischen Insulin R und Insulin S. So konnte durch beide Insuline eine Stimulation der Milzzellen erreicht werden.

Als problematisch erwiesen sich die hohen Standardabweichungen in Verbindung mit der oben angesprochenen, relativ niedrigen Gesamtstimulation (vgl. Tab. 5). Somit sind die Testergebnisse hinsichtlich der Wirkung von PVP-Insulin nicht signifikant, obwohl bei den mit PVP-Insulin vorbehandelten Tieren die Steigerung der Mitoserate im Vergleich zur Referenzgruppe niedriger ausgefallen war.

Die dargestellten Effekte können deshalb, wie schon erwähnt, nur als Hinweise auf derartige Wirkungen angesehen werden.

Aus den genannten Gründen wurde eine weitere Überprüfung anhand anderer Testmethoden angestrebt.

4. Die Ergebnisse des haemolytischen Plaque-Testes

Die größte Schwierigkeit beim haemolytischen Plaque-Test ergab sich aus der Kopplung von Insulin an die Erythrozytenoberfläche. Konventionelle Methoden mit Chromchlorid oder Tanninsäure, wobei methodisch nach Weir et al. (54) vorgegangen wurde, bleiben bei Insulin erfolglos. Dasselbe Ergebnis erzielten auch Schroer et al. mit den genannten Verfahren, wobei diese die Kopplung von

sehr kleinen Proteinen wie Insulin an Zellen aus vier Gründen für komplikationsreich erachten (42). Danach dürfen durch die Kopplungsreagenzien aufgrund der Antigenerkennung nur wenige Stellen des Proteinmoleküls besetzt werden. Desweiteren darf durch die Kopplungsbezirke die dreidimensionale Struktur des Moleküls nicht zerstört werden. Eine ähnliche Lage und enge Abstände der Antigenmoleküle sind für die Antigen-Antikörper-Reaktion ebenfalls von ausschlaggebender Bedeutung. Zuletzt ist auch noch ein hinreichender Abstand des Antigens von der Erythrozytenoberfläche entscheidend um sterische Behinderungen auszuschließen.

Von denselben Autoren (42) wird dann auch ein Verfahren vorgestellt, wonach die Kopplung von Insulin an die Erythrozytenoberfläche erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Dieses Verfahren stützt sich auf die beiden bifunktionalen Reagenzien Methyl-4-mercaptobutyrimidate (MBI) und m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimide-ester (MBS). Nähere Angaben hierzu sind dem Material- und Methodenteil zu entnehmen. Nach geglückter Insulinkopplung zeigte der haemolytische Plaque-Test durchweg positive Ergebnisse.

Die Überprüfung des Testes hinsichtlich Eignung für das geplante Experiment verlief zufriedenstellend. Es waren genügend antikörpersezernierende Zellen nachweisbar, die Kontrollen zeigten keine Plaquebildung und durch Zusatz von freiem Insulin ließ sich die Zahl der Haemolyse-Plaques gegen Null absenken, wodurch die Spezifität des Testes nachgewiesen werden konnte.

Da in Anlehnung an die Literatur (20, 42, 49) hier neben IgG sezernierenden Zellen allenfalls noch IgM sezernierende Zellen (direkte Plaques) zu erwarten waren, konnte für den Test ein hinsichtlich der Immunglobulin-klassen unspezifisches Anti-Maus-Ig-Serum verwendet

werden. Die Aufschlüsselung der IgG-Subklassen erfolgte später.

Wie sich zeigte, waren IgM sezernierende Zellen bei allen durchgeführten Plaque-Testen zu vernachlässigen, zumal die Tiere nach dem Schema einer Sekundärantwort vorbehandelt waren.

Die Ergebnisse im Einzelnen stellen sich wie folgt dar (vgl. auch D.V.2.):

Die nur mit PVP behandelte Referenzgruppe weist 180 PFC (plaque-forming cells) auf. Im Gegensatz dazu sinkt die Zahl der PFC bei der mit PVP-Insulin R behandelten Gruppe um ca. 32 % auf 122 PFC ab, bei der mit PVP-Insulin S behandelten Gruppe um ca. 44 % auf 101 PFC.

Wie aus Abb. 8 weiterhin zu entnehmen ist, waren die Standardabweichungen vergleichsweise gering.

Durch den haemolytischen Plaque-Test konnte somit auf der Ebene der antikörpersezernierenden Zellen im Rahmen einer Sekundärantwort die reduzierende Wirkung von PVP-Insulin auf die spezifische Immunantwort gegenüber Insulin eindeutig und signifikant nachgewiesen werden.

Im nachfolgenden Experiment war versucht worden, die IgG-Subklassenspezifität der Anti-Insulin-Immunantwort unter PVP-Insulin nachzuweisen.

Hierbei wurden beim Plaque-Test subklassenspezifische Antiseren hinzugegeben, um auf diese Weise subklassenspezifische Plaques nachweisen zu können.

Wie die Ergebnisse aufweisen (D.V.3.), konnten hier nur IgG1-sezernierende Zellen signifikant nachgewiesen werden. Auch im Rahmen dieses Experimentes zeigte sich die Zellsuppression durch Vorbehandlung mit PVP-Insulin deutlich. So konnte die Zahl der sezernierenden Zellen

durch PVP-Insulin auf fast 50 % des Vergleichswertes (PVP-Gruppe) reduziert werden. Da im wesentlichen nur IgG1 gebildet wurde, findet die Reduzierung der spezifischen Immunantwort ebenfalls nur im Rahmen dieser Subklasse statt.

Bezüglich der sezernierten IgG-Subklassen fanden Schroer et al. (42) bei ihren insulinspezifischen Plaque-Testen neben IgG1 noch IgG2, wobei beide Subklassen in etwa zu gleichen Teilen gebildet wurden. Diese Experimente sind mit dem hier vorgestellten jedoch aus folgenden Gründen nicht direkt vergleichbar:

Bei Schroer et al. erfolgte die Immunisierung der Tiere in die Hinterpfoten und nicht intraperitoneal; die Lymphozyten für die Subklassenbestimmung wurden aus den Popliteal- und Inguinallymphknoten und nicht aus der Milz gewonnen.

Desweiteren wurden die Tiere bei diesen Autoren im Rahmen einer Primärantwort vorbehandelt, im Gegensatz zu der hier vorliegenden Sekundärantwort. Auch wurde der hier verwendete Mäusestamm Balb/C hinsichtlich der Subklassenbestimmung nicht mit ausgetestet.

Die genannten Angaben zeigen mögliche Ursachen hinsichtlich der unterschiedlichen Subklassenaufteilung auf.

5. Der Zelltransfer und seine Aussagen

Nachdem die Wirksamkeit des PVP-Insulins bereits durch mehrere Tests nachgewiesen werden konnte, sollte das Zelltransferexperiment weitere noch offenstehende Fragen klären.

Das Behandlungsschema hierzu ist dem Ergebnisteil zu entnehmen.

Obwohl bereits durch den Plaque-Test die Reduzierung der Immunantwort auf zellulärer Basis nachgewiesen werden konnte, zeigte der Zelltransfer nochmals deutlich, daß die spezifische Immunsuppression durch PVP-Insulin-Konjugate nicht auf einem "Wegfangen" der gebildeten Antikörper durch das im PVP-Insulin gebundene Insulin beruht, was man aufgrund der gemessenen Antikörperaktivitäten hätte vermuten können.

Werden Milzzellen von Spendertieren übertragen, welche nach der Immunisierung nur mit PVP vorbehandelt worden waren (Referenzgruppe), so weisen die Empfängertiere eine mit den Ergebnissen der Primärantwort (D.II.) durchaus vergleichbare Antikörperaktivität von 42 % Bindungskapazität gegenüber ^{125}J -markiertem Insulin auf.

Bei Übertragung von Milzzellen aus Spendertieren, welche nach der Immunisierung mit PVP-Insulin supprimiert worden waren, sinkt die Antikörperaktivität um fast 60 % auf 17 % Bindungskapazität ab.

Eine "aktive" Suppression um ca. 35 % auf 27,5 % Bindungskapazität zeigt sich durch Übertragung eines Zellgemisches aus nicht supprimierten und supprimierten Tieren, obwohl diese Gruppe dadurch insgesamt die doppelte Anzahl an Milzzellen erhalten hatte. Durch Milz-lymphozyten aus mit PVP-Insulin supprimierten Spendern wird in diesem Fall eine Reduzierung der Immunantwort der gleichzeitig übertragenen, nicht mit PVP-Insulin supprimierten Milzzellpopulationen erreicht.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß der Reduzierung der spezifischen Immunantwort durch PVP-Insuline eine Regulation auf zellulärer Basis zugrunde liegt.

Basierend auf der Kenntnis, daß Schweineinsulin nicht in allen Mäusestämmen eine immunogene Wirkung zeigt (21), konnten Keck und Momayezi anhand von Studien an C3H/He Mäusen (23, 24) eine Toleranzinduktion gegenüber immunogenen Insulinen durch Vorbehandlung mit dem nicht immunogenen Schweineinsulin nachweisen.

In weiterführenden Untersuchungen gelang es den beiden Autoren den Mechanismus weiter aufzuklären. Hierbei (33) konnte anhand eines Zelltransferexperimentes an Balb/K Mäusen, bei welchen ebenfalls eine Toleranzinduktion durch Vorbehandlung mit Schweineinsulin zu erreichen war, die Präsenz von insulinspezifischen Suppressorzellen aufgezeigt werden.

Thomas et al. (49) konnten an "high responder" Mäusen durch Vorbehandlung mit modifizierten Insulinen (TNF-Rinderinsulin oder Rinderinsulinester) die Immunantwort gegenüber Rinderinsulin reduzieren. Auch von diesen Autoren werden spezifische Suppressorzellen als mögliche Regulatorien diskutiert.

Aus Untersuchungen mit an PVP gekoppelten Haptenen (31) ist weiterhin bekannt, daß diese spezifische T-Suppressorzellen induzieren. Dieser Nachweis gelang durch den Transfer von T-Zell-Populationen in bestrahlte Empfängertiere im Vergleich zu übertragenen B-Zell-Populationen.

Somit läßt sich zusammenfassend folgende Aussage treffen:

Obwohl durch eigene Experimente der Mechanismus einer Reduzierung der Immunantwort durch PVP-Insuline nicht hinreichend abgeklärt werden konnte, kann auch hier eine Regulation durch Induktion von spezifischen T-Suppressorzellen vermutet werden, zumal auch eine "aktive" Suppression durch Milzlymphozyten anhand des Zelltransfers nachweisbar war.

II. PVP-Insulin als neuer therapeutischer Ansatz gegen Insulin-Resistenz

Bevor über die Rolle des PVP-Insulins im Rahmen der therapeutischen Möglichkeiten gegen die Insulin-Resistenz diskutiert werden kann, müssen zunächst noch die begünstigenden Faktoren für die Entwicklung einer Resistenz sowie die bisher praktizierten Behandlungsformen angesprochen werden.

Nach Auflistungen von Reeves (36) sowie Schernthaner und Mayr (40) beeinflussen folgende Faktoren die Immunogenität der einzelnen Insulin-Präparationen:

Der pH, die Löslichkeit und der Gehalt an Zink sowie Verzögerungssubstanzen wie z. B. Protamin. Desweiteren die Reinheit, die Speziesspezifität und die Darreichungsform der Insuline.

Alter, Geschlecht und Infektionen spielen ebenso eine Rolle, wie die konstitutionelle Variationsbreite (Gene).

Im Gegensatz zu Neubauer und Schöne (34) ist nach Reeves (36) für die Entstehung einer Insulin-Resistenz die Reinheit der Insulinpräparate von größerer Bedeutung als die Speziesspezifität.

Auch wird von diesem Autor bezüglich der größeren Immunogenität von Rinderinsulin im Vergleich zu Schweineinsulin, neben der unterschiedlichen Aminosäuresequenz (Schweineinsulin unterscheidet sich vom Humaninsulin in 1 Aminosäure, Rinderinsulin in 3 Aminosäuren) auch noch die geringere Löslichkeit des Rinderinsulins als möglicher beeinflussender Faktor angesprochen.

Bertrams und Grünekle (4) sowie Schernthaner und Mayr (40) konnten neben anderen eine Korrelation zwischen der Entwicklung von Insulinantikörpern und bestimmten Genen nachweisen.

Hansen et al. (14) sehen die Immunogenität des Insulins in Abhängigkeit vom molekularem Zustand. Nach Auffassung dieser Autoren entstehen die immunogenen Determinanten des Insulins möglicherweise während der Extraktion und Isolation aus dem Pankreas; das Insulin selbst wird als schwaches Immunogen betrachtet.

Federlin et al. (12) geben einen Überblick über bisher bestehende Therapiemöglichkeiten der Insulin-Resistenz:

Eine dieser Behandlungsformen ist der Wechsel von Rinderinsulin auf das weniger immunogen wirkende Schweineinsulin. Eine weitere die Gabe von ansteigenden Dosen, wobei möglicherweise eine Toleranz zu erzielen ist. Die intravenöse Anwendung von Insulin zur Erzeugung einer Hochdosentoleranz birgt die Gefahr eines anaphylaktischen Schocks in sich. Die letzte der von Federlin et al. (12) angegebenen Therapieformen besteht in der Anwendung von Steroiden (z. B. Prednison), wobei diese selbst diabetogen wirken (7).

Eine ebenfalls noch erwähnenswerte Möglichkeit ist die Verwendung von Des-Phe-Insulinen, wobei die endständige Aminosäure Phenylalanin (an Position 1 der B-Kette) abgespalten wird.

Diese Insuline binden signifikant weniger Insulinantikörper, wirken aber im Tierversuch genauso immunogen wie unveränderte Insuline (26).

Obwohl durch die Einführung von Humaninsulin in die Diabetestherapie ein starker Rückgang der immunologischen Komplikationen erwartet wurde (30), gelang es

Deckert et al. (8) bereits 1972 durch Immunisierung mit homologem Insulin beim Menschen eine Antikörperbildung zu erreichen.

Federlin et al. (11) konnten 1981 anhand von Bindungsstudien aufzeigen, daß auch Humaninsulin von praeformierten Antikörpern gegen Schweine- oder Rinderinsulin

gebunden wird. Daraus wurde gefolgert, daß durch Anwendung von biosynthetischem Humaninsulin der tägliche Insulinbedarf bei Diabetikern mit praeformierten Antikörpern gegen Tierinsuline nicht zwangsläufig gesenkt werden kann, was vor allem bei einer Behandlungsumstellung auf das menschliche Insulin von Bedeutung ist.

Fankhauser et al. (9) sowie Schernthaner et al. (39) konnten bei Diabetikern, welche ausschließlich mit semisynthetischem Humaninsulin behandelt worden waren, etwa in einem Drittel der Fälle eine Antikörperbildung nachweisen.

Aus dem genannten läßt sich schließen, daß die immunologischen Komplikationen im Rahmen einer Diabetes-therapie selbst bei Verwendung des neuen, inzwischen verfügbaren Humaninsulins teilweise nach wie vor bestehen bleiben, wenn auch die Häufigkeit insgesamt in größerem Maße abnimmt.

So wurde auch von Kahn und Rosenthal (19) durch den Einsatz von Humaninsulin ein möglicher Rückgang der Komplikationsrate in Betracht gezogen, ein vollständiges Verschwinden der Problematik jedoch nicht erwartet.

Da zudem hohe Antikörpertiter bzw. zirkulierende Immunkomplexe bei der Entstehung von Spätschäden des Diabetikers möglicherweise eine Rolle spielen, ist die Suche nach weiteren therapeutischen Methoden gegen eine gesteigerte Bildung von Insulinantikörpern auch in Zukunft wichtig.

In der vorliegenden Arbeit war versucht worden, einen neuen therapeutischen Ansatz gegen die antikörper-induzierte Insulin-Resistenz bei Diabetikern zu finden.

Anhand des Tiermodells konnte nachgewiesen werden, daß durch eine Vorbehandlung mit PVP-Insulin-Konjugaten die Antikörperbildung gegen artfremdes Insulin stark reduziert

werden kann.

Wenn es in weiterführenden Untersuchungen gelingt, den bisher noch ausstehenden Nachweis einer ausreichenden klinischen Wirksamkeit des PVP-Insulins zu erbringen, könnten PVP-Insulin-Konjugate bei insulinresistenten Diabetikern als neue Behandlungsform eingesetzt werden. Läßt sich eine Insulin-Resistenz z. B. durch den Wechsel des Insulinpräparates nicht unter Kontrolle bringen, so könnte der Einsatz von PVP-Insulinen erfolgversprechend sein.

Desweiteren sind im Gegensatz zu anderen Therapiemethoden (z. B. intravenöse Anwendung von Insulin oder Steroidgaben) bei Verwendung von PVP-Insulin nahezu keine Nebenwirkungen zu erwarten. Einen Überblick hierzu geben Wessel et al. (55). Danach verhält sich das PVP-Molekül chemisch weitgehend neutral, so daß seine Toxizität gering ist. Da durch Anwendung von PVP beim Menschen keinerlei antigene Effekte nachgewiesen werden konnten, sind somit auch keine allergischen Reaktionen zu erwarten.

Die nach dem beschriebenen Verfahren hergestellten PVP-Insulin-Konjugate (Verwendung einer niedermolekularen Form) zerfallen nach Abspaltung des Insulins durch Proteinasen in Einzelmoleküle vom Molekulargewichten um die 10.000.

Da Polymere dieser Größe vollständig von der Niere ausgeschieden werden können, treten somit auch keine Retentionsprobleme auf. Höher polymerisierte PVP-Moleküle (Molekulargewicht über 20.000) werden je nach Molekülgröße teilweise oder nahezu vollständig im RES gespeichert und können auch zur Granulombildung führen. (55) Aufgrund der bereits genannten, vollständigen renalen Elimination besteht diese Gefahr bei den PVP-Insulinen jedoch nicht, was wiederum unterstreicht, daß ein Einsatz von PVP-Insulin gegen die antikörperinduzierte Insulin-Resistenz bei Diabetikern durchaus möglich wäre.

F. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen neuen therapeutischen Ansatz gegen die antikörperinduzierte Insulin-Resistenz bei Diabetikern zu finden.

In früheren Untersuchungen (31, 44, 45) konnte bereits gezeigt werden, daß die Immunantwort auf Proteine und Haptene protein- oder haptenspezifisch unterdrückt werden kann, indem man das entsprechende Protein oder Hapten an das Polymer Polyvinylpyrrolidon (=PVP) koppelt, welches früher als Plasmeexpander Verwendung fand.

Es wurde versucht durch Kopplung von Rinder- oder Schweineinsulin an PVP ähnliche Effekte auf die Immunantwort gegenüber nativem Insulin zu erreichen. Hierzu wurden zwischen Mai 1981 und Juni 1983 am Institut für Chirurgische Forschung in München an BALB/C Mäusen Tierexperimente durchgeführt. Anhand der Messung von Serumantikörperaktivitäten (in % Bindungskapazität gegenüber ^{125}J -Insulin) im Rahmen einer Primärantwort sowie durch den haemolytischen Plaque-Test konnte signifikant nachgewiesen werden, daß die Immunantwort gegenüber Insulin durch Vorbehandlung mit PVP-Insulin-Konjugaten in großem Umfang reduziert werden kann. Der ebenfalls angewandte Lymphozytentransformationstest erwies sich aufgrund hoher Standardabweichungen in Verbindung mit einer relativ niedrigen Stimulationsrate zum Nachweis der oben angeführten Wirkung von PVP-Insulinen im Hinblick auf die Signifikanz als ungeeignet.

Durch ein Zelltransferexperiment konnte aufgezeigt werden, daß der Reduzierung der spezifischen Immunantwort mit PVP-Insulin-Konjugaten eine Regulation auf zellulärer Basis zugrunde liegt. Nachdem in Untersuchungen mit PVP-Hapten-Konjugaten (31) die Induktion von spezifischen T-Suppressorzellen nachgewiesen werden konnte, läßt sich auch bei PVP-Insulinen auf eine Regulation durch

T-Suppressorzellen schließen (vgl. auch Diskussion).
Ein Nachweis einer ausreichenden klinischen Wirksamkeit
von PVP-Insulin konnte anhand der dargestellten
Experimente nicht geführt werden.

Dieser Nachweis verlangt nach umfangreichen Untersuchungen
mit großen Versuchszeiträumen sowohl am Tiermodell als
auch am Menschen, wie auch durch den Versuch die klinische
Situation eines insulinresistenten Diabetikers am Tier
zu simulieren (D.VII.) dargestellt werden konnte.

Zusammenfassend läßt sich folgende Aussage treffen:

Wie die aufgezeigten Ergebnisse signifikant beweisen,
kann die Immunantwort gegenüber Insulin am Tiermodell
durch PVP-Insulin-Konjugate im Sinne einer starken
Reduktion der Antikörperbildung supprimiert werden.
Hiermit ist der erste Schritt auf der Suche nach neuen
therapeutischen Möglichkeiten gegen die antikörper-
induzierte Insulin-Resistenz bei Diabetikern getan.

Ein Einsatz von PVP-Insulinen bei insulinresistenten
Diabetikern wäre neben anderen Therapiemethoden somit in
Zukunft durchaus möglich.

G. Literaturverzeichnis

1. Arquilla E.R., Valdes I., Thompson R.,
Michalski R.E., Thomas K.
Differences in insulin antibodies induced
with varying antigenic forms
In: Basic and clinical aspects of
immunity to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 163-182 (1981)
2. Berson S.A., Yalow R.S.
Quantitative aspects of the reaction between
insulin and insulin-binding antibody
J. Clin. Invest. 38: 1996-2016 (1959)
3. Berson S.A., Yalow R.S.
Species-specificity of human anti-beef, pork
insulin serum
J. Clin. Invest. 38: 2017-2025 (1959)
4. Bertrams J., Grünekle D.
HLA-DR association of humoral immunoresponsive-
ness to insulin in insulin-dependent (Type I)
diabetes mellitus
In: Basic and clinical aspects of immunity
to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 253-262 (1981)
5. Brandenburg D., Ooms H.A.
Des Glycine A¹, des Phenylalanine B¹- Insulin
and Related Insulin Derivatives
Proceedings International Symposium on
Protein and Polypeptide Hormones
Liege, 482-484 (1978)
Ed: M. Margoulies, Excerpta Medica, Amsterdam

6. Cuatrecasas P.
Interaction of insulin with the cell
membrane: The primary action of insulin
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63: 450-457 (1969)
7. Daweke M.
Klinik der Insulinresistenz
Dtsch. med. Wschr. 91: 973-978 (1966)
8. Deckert T., Anderson O.O., Grundahl E.,
Kerp L.
Isoimmunization of man by recrystallized
human insulin
Diabetologia 8: 358-361 (1972)
9. Fankhauser S., Herz G., Zuppinger K.
Erfahrungen mit Humaninsulin bei
diabetischen Kindern
In: Neue Insuline
1. Internationales Symposium
Hrsg: K.-G. Petersen, K.J. Schlüter, L. Kerp
Freiburg 1982 201-209
10. Federlin K., Ditschuneit H., Pfeiffer E.F.
Insulinallergie und Insulinresistenz
In: Handbuch des Diabetes, Bd II
München, I.F. Lehmanns (1971)
11. Federlin K., Laube H., Velcovsky H.-G.
Biologic and immunologic in vivo and
in vitro studies with biosynthetic human insulin
Diabetes Care, Vol 4, No 2: 170-174 (1981)
12. Federlin K., Velcovsky H.-G., Mäser E.
Clinical aspects of immunity to insulin
In: Basic and clinical aspects of immunity to
insulin
ed. by K. Keck, P. Erb;
Berlin, New York: de Gruyter 203-218 (1981)

13. Goldstein H.H.
Allergy and diabetes
In: Joslin's diabetes mellitus
ed. by Marble A., White P., Bradley R.F.,
Krall L.-P.
Philadelphia, Lea a. Febiger (1971)
14. Hansen B., Nielsen J.H., Welinder B.
Immunogenicity of insulin in relation to its
physicochemical properties
In: Basic and clinical aspects of immunity
to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 335-352 (1981)
15. Herrmann W.P., Schulz K.H., Wehrmann R.
Zur Pathogenese der Insulinallergie
Derm. Wschr. 139: 73 (1959)
16. Heymer B., Bernstein D., Schleifer K.H., Krause R.M.
A radioactive hapten-binding assay for
measuring antibodies to the pentapeptide
determinant of peptidoglycan
J. Immunol. Vol. 114, No. 4: 1191-1196 (1975)
17. Joslin E.P., Gray H.F., Root H.F.
Insulin in hospital and home
J. metab. Res. 23: 324 A (1975)
18. Kahn C.R.
Role of insulin receptors in insulin-resistant
states
Metabolism, Vol. 29, No. 5: 455-466 (1980)
19. Kahn C.R., Rosenthal A.S.
Immunologic reactions to insulin: Insulin
allergy, insulin resistance and the autoimmune
insulin syndrome
Diabetes Care Vol. 2 No. 3: 283-295 (1979)

20. Kapp J.A., Bucy R.P.
Ir gene control of the insulinspecific immune response in mice
In: Basic and clinical aspects of immunity to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 71-80 (1981)
21. Keck K.
Ir gene control of immunogenicity of insulin and A-chain loop as a carrier determinant
Nature 254: 78-79 (1975)
22. Keck K.
Insulin as a tool for the study of immunological problems
In: Basic and clinical aspects of immunity to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 3-16 (1981)
23. Keck K.
Suppression of antibody production against insulin in mice
Diabetologia 13: 407 (1977)
24. Keck K., Momayezi M.
Influence of non H-2 linked Ir genes on the response of mice to insulins of different species
J. Immunol. 121: 1612 (1978)
25. Kerp L., Kasemir H., Kielsing F.
Insulinbindende Antikörper und Insulinbedarf bei Diabetikern
Klin. Wschr. 46: 376-385 (1968)

26. Kerp L., Steinhilber S., Kasemir H., Hahn J.,
Heinrichs H., Geiger R.
Changes in immunospecificity and biologic
activity of bovine insulin due to subsequent
removal of the amino acids B1, B2 and B3
Diabetes 23: 651-656 (1974)
27. Kerp L., Steinhilber S., Kielsing F., Creutzfeldt W.
Klinische und experimentelle Untersuchungen
zur Insulinallergie und Insulinresistenz
Dtsch. med. Wschr. 90: 806-814 (1965)
28. Kontiainen S., Scheinin T.
Suppression of insulin responses in vitro
In: Basic and clinical aspects of immunity
to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gruyter 143-155 (1981)
29. Kühnau jr., J.
Insulin-Allergie und Insulin-Resistenz
In: Handbuch der Inneren Medizin,
Bd. 7/2 B: Diabetes mellitus,
hrsg. v. K. Oberdisse
Springer Berlin 837-872 (1977)
30. Kurtz A.B., Nabarro J.D.N.
Circulating Insulin-binding Antibodies
Diabetologia 19: 329-334 (1980)
31. Lee W.Y., Sehon A.H., v. Specht B.U.
Suppression of IgE antibodies to the
(4-hydroxy-3-jodo-5-nitrophenyl)acetyl (NIP)
group and induction of NIP-specific suppressor
cells with NIP-poly(N-vinylpyrrolidon) conjugates
Eur. J. Immunol. 11: 13-17 (1981)

32. Martin P.W., Martin H.E., Lyster R.W., Strouse S.
Insulinresistance. Critical survey of the
literature with the report of a case
J. clin. Endocr. 1: 387 (1941)
33. Momayezi M., Keck K.
Induction of immunity and suppression by
pig insulin in mice
In: Basic and clinical aspects of immunity
to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 115-126 (1981)
34. Neubauer H.P., Schöne H.H.
The immunogenicity of insulin from our
point of view
In: Basic and clinical aspects of immunity
to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 367-372 (1981)
35. Plautz M., Little J.A.
An immunoassay for insulin antibodies in
humans: Their development in diabetics
treated with sulfated or Lente insulin
Diabetes 19 (Suppl. 1): 371-372 (1970)
36. Reeves W.G.
Antibody production during insulin
therapy - patterns of response and
clinical sequels
In: Basic and clinical aspects of immunity
to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 219-235 (1981)

37. Root, H.F.
Insulin Resistance and Bronze Diabetes
New Engl. J. Med. 201:201 (1929)
38. Rosenthal A.S., Lin C.S., Hansen T., Thomas J.W.,
Danho W., Bullesbach E., Föhles J.
Genetic control of the immune response to insulin
In: Basic an clinical aspects of immunity
to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 17-29 (1981)
39. Schernthaner G., Borkenstein M., Mathä R.,
Mayr W.R., Hohenecker J., Prager R., Schober E.,
Susani M.
Semisynthetisches und biosynthetisches Human-
insulin: Immunogenitätsuntersuchungen nach
Langzeittherapie bei Typ-I Diabetikern und
Bindungsanalysen an praeformierten
IgG-Insulinantikörpern und Insulinrezeptoren
In: Neue Insuline
1. Internationales Symposium
Hrsg.: K.-G. Petersen, K.J. Schlüter, L. Kerp
Freiburg 1982 140-148
40. Schernthaner G., Mayr W. R.
Insulin antibody formation following
conventional or monocomponent insulin treatment
is influenced by genes of the HLA-DR locus
In: Basic and clinical aspects of immunity
to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 263-274 (1981)
41. Schirren, C.G.
Ein ungewöhnlicher Fall von lokaler Insulin-
anaphylaxie
Hautarzt 4: 531 (1953)

42. Schroer J.A., Inman J.K., Thomas J.W., Rosenthal A.S.
H-2-linked Ir gene control of antibody
responses to insulin
I: Anti-insulin plaque-forming cell primary
responses
J. Immunol. Vol. 123, No. 2: 670-675 (1979)
43. Singh B., Fraga E.
Immunogenic determinants of insulin:
Synthesis and immunogenicity of the A-chain
loop peptides of beef insulin
In: Basic and clinical aspects of immunity
to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gruyter 45-57 (1981)
44. Smorodinsky N., v. Specht B.U., Cesla R.,
Shaltiel S.
A conjugate between a purified Thymocyte
allergen and poly(N-vinylpyrrolidone) suppresses
the specific IgE response in mice
Immunol. Letters 2: 305-309 (1981)
45. v. Specht B.U., Milgrom L., Segal S.
Induction of a stable hapten-specific
immunosuppression by a hapten conjugated
to poly(N-vinylpyrrolidone) (PVP)
Clin. Exp. Immunol. 33: 292-297 (1978)
46. v. Specht B.U., Kolb H.J., Renner R., Hepp K.D.
Preparation and physical-chemical
characterization of poly-N-vinylpyrrolidone-
insulin
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 359: 231-238
(1978)

47. Talmon J., Maron R., Gotlib E., Cohen I.R.
Analysis of H-2 gene regulation of the
response of T lymphocytes to insulin using
synthetic antigenic determinants and
anti-idiotypes
In: Basic and clinical aspects of immunity
to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 59-69 (1981)
48. Thomas J.W., Bucy R.P., Kapp J.A.
T-cell-independent responses to an Ir gene-
controlled antigen
I.: Characteristics of the immune response
to insulin complexed to Brucella abortus
J. Immunol. Vol. 129, No. 1: 6-10 (1982)
49. Thomas J.W., Kapp J.A., Schroer J.A., Rosenthal A.S.
Influence of insulin modification upon the
immune response to insulin
In: Basic and clinical aspects of immunity
to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gryter 81-91 (1981)
50. Tucker W.R., Klink D., Goetz F., Zalme E.,
Knokles jr. H.C.
Insulin resistance and acanthosis nigricans
Diabetes 13: 395 (1964)
51. Tuft L.
Insulin hypersensitiveness: Immunologic
considerations and case reports
Amer. J. med. Sci. 176:707 (1928)

52. Velcovsky H.-G., Mäser E., Federlin K.
Studies of the immunogenicity of
chromatographically purified insulins
in Type-I and Type-II diabetics
In: Basic and clinical aspects of
immunity to insulin
ed. by K. Keck, P. Erb
Berlin, New York: de Gruyter 237-246 (1981)
53. Walter P., v. Specht B.U., Kolb H., Brandenburg D.,
Rapp. J., Brendel W.
Insulinspezifische Immunsuppression durch
Kovalent an Poly(N-vinylpyrrolidon) (PVP)
gebundenes Insulin
Allergologie, Jahrgang 6, Nr. 7: 272-276 (1983)
54. Weir D. M. (ed.)
Handbook of Experimental Immunology
3. Ed. Oxford: Blackwell, 1978
20.6 - 20.12
28.13 - 28.14
55. Wessel W., Schoog M., Winkler E.
Polyvinylpyrrolidone (PVP), its diagnostic,
therapeutic and technical application and
consequences thereof
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)
Jahrgang 21, Nr. 10: 1468 (1971)

Danksagung

Zu besonderem Dank bin ich verpflichtet:

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die außerordentlich freundliche Aufnahme in seinem Institut.

Herrn Priv. Doz. Dr. B.U. von Specht für die Einführung in das experimentelle Arbeiten, seine uneigennützige Unterstützung und stets verständnisvolle Beratung.

Herrn Prof. Dr. H. Kolb für die Bestimmung der Serumantikörperaktivität.

Herrn Prof. Dr. D. Brandenburg für die Überlassung des modifizierten Insulins.

Herrn Priv. Doz. Dr. P. Walter für seine hilfreiche Unterstützung.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, die mir bei der Durchführung der Experimente mit Rat und Tat zur Seite standen.

Lebenslauf

19. Oktober 1957	Geburt in München als ältester Sohn des Werbekaufmanns Hans Rapp und seiner Frau Helma
1964 - 1968	Besuch der Volksschule in München
1968 - 1977	Besuch des Gisela-Gymnasiums in München
Mai 1977	Abitur
Januar 1978	Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter
Mai 1978	Beginn des Studiums der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
März 1980	Ärztliche Vorprüfung
Mai 1981	Beginn der Mitarbeit am Institut für Chirurgische Forschung in München
Mai 1984	Abschluß des Staatsexamens und Approbation
Mai 1984 - Juni 1985	Assistenzarzt am Bundeswehrkrankenhaus München
Seit Juli 1985	Truppenarzt in der Bayern-Kaserne München

